

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und
Krankenhaushygiene der Heinrich Heine Universität
Düsseldorf

Direktor: Univ. Prof. Dr. med. K. Pfeffer

Thema:

Vorkommen und Verbreitungsmechanismen von
Integron-Resistenzgenkassetten bei Gram-
negativen Erregern in der Intensivmedizin

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich Heine Universität
Düsseldorf

vorgelegt von

Thomas Garn

2008

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

gez: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Bernd Nürnberg
Dekan

Refrent:	PD Dr. med. R. Schulze-Röbbcke
Korrefferent:	Prof. Dr. F.-J. Schmitz

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Allgemeiner Teil	1
1.2 Nosokomiales Erregerspektrum	2
1.2.1 Enterobacteriaceae	2
1.2.2 Vorkommen von Enterobacteriaceae	3
1.2.3 Einteilung der Enterobacteriaceae	3
1.2.4 Resistenzentwicklung bei Gram-negativen Bakterien	3
1.3 Integrans	4
1.3.1 Aufbau von Integrans	4
1.3.2 Resistenzwege / Genkassetten	6
1.3.3 Rekombinationsschnittstellen	7
1.3.4 Integrasen und Integronklassen	7
1.3.5 Beitrag von Integrans zur Resistenzentwicklung	9
1.3.6 Entstehung von Resistenzphänomenen	9
1.3.7 Konservierung bestehender Resistenzen bei nachlassendem Antibiotikaselektionsdruck	9
1.3.8 Integronepidemiologie	10
1.4 Fragestellung	12
2. Material und Methoden	13
2.1 Untersuchungsmaterial und Probenentnahme	13
2.2 Datenerhebung	13
2.2.1 Einleitung	13
2.2.2 APACHE II	14
2.2.3 Clinical Pulmonary Infection Score (CPIS)	17
2.2.4 Sepsis-related Organ Failure (SOFA)	18
2.2.5 Antimikrobielle Therapie	20
2.2.6 Zusätzliche Parameter / Daten	20
2.3 Mikrobiologische Untersuchung des klinischen Untersuchungsmaterials	20
2.4 Selektion der Gram-negativen Bakterien	21

2.5 Differenzierung Enterobakteriazeen / Nonfermenter	21
2.6 Biochemische Differenzierung der Bakterien	22
2.6.1 Durchführung des Api®20E	22
2.6.2 Durchführung des Api®20NE	23
2.7 Phenotypische Resistenzbestimmung (MICRONAUT®)	24
2.7.1 Einleitung	24
2.7.2 Arbeitsschritte	25
2.7.3 Auswertung	25
2.7.4 ESBL Erkennung	30
2.8 Rapid amplified polymorphic DNA (RAPD)	34
2.8.1 Allgemeine Verfahrensbeschreibung	34
2.8.2 Vorbereitung	35
2.8.3 Reaktionsansatz	35
2.8.4 Durchführung der RAPD	35
2.8.5 Temperaturen und Zyklen	36
2.8.6 Gelelektrophorese	36
2.9 Polymerasekettenreaktion (PCR)	36
2.9.1 Allgemeine Verfahrensbeschreibung	36
2.9.1.1 Einleitung	36
2.9.1.2 Vorbereitung	37
2.9.1.3 Reaktionsansatz	38
2.9.1.4 Durchführung der PCR	38
2.9.1.5 Temperaturen und Zyklen	38
2.9.2 Gelelektrophorese	39
2.9.2.1 Einleitung	39
2.9.2.2 Gelherstellung	39
2.9.2.3 Probenvorbereitung	39
2.9.2.3 Durchführung	39
2.10 Sequenzierung der gefundenen Genkassetten	40
2.10.1 Gelextraktion und Aufreinigung	40
2.10.2 Sequenzierungstechnik	41

3. Ergebnisse	45
3.1 Allgemeiner Teil	45
3.2 Klinische Aspekte des Patientenkollektivs	46
3.3. Mikrobiologische Untersuchungsergebnisse	54
3.4. Statistische Untersuchung der Ergebnisse	67
4. Diskussion	69
4.1 Einleitung	69
4.2 Vorarbeiten zur Epidemiologie von Integronherkunft und –verbreitung	69
4.3. Schwerpunkt dieser Studie	69
4.4. Integron-vermittelte Resistenz: Unterscheidung zwischen klonaler Verbreitung Integron-haltiger Bakterienisolate und der Verbreitung von Integrans auf nosokomiale Erreger?	71
4.5. Auftreten von ESBL	73
4.6. Welche Rolle spielen die Integrans bei der Verbreitung von ESBL	73
5. Literaturverzeichnis	75
6. Lebenslauf	82
7. Danksagung / Widmung	83
8. Zusammenfassung	85

1. Einleitung

1.1 Allgemeiner Teil

Die moderne Medizin sieht sich heute mit einer rasch zunehmenden Verbreitung von Antibiotikaresistenzen konfrontiert. Eine Vielzahl unterschiedlicher Wirkstoffe nahezu aller im klinischen Alltag eingesetzten Antibiotikaklassen ist davon betroffen. Vor allem die Verbreitung multiresistenter bakterieller Erreger im Bereich von Intensivstationen wird seit der gesetzlich festgelegten Dokumentationspflicht im Jahre 2001 (Infektionsschutzgesetz, IFSG, §23) als besorgniserregender Trend wahrgenommen.

Bei den Gram- positiven nosokomialen Erregern, wie Vancomycin- resistenten Enterokokken (VRE) und Methicillin- resistentem *S. aureus* (MRSA) sind trotz intensiver Bemühungen zur Eindämmung in den vergangenen Jahren weite Verbreitung und schnelle Zuwachsraten zu verzeichnen ⁷² (s.Abb.1).

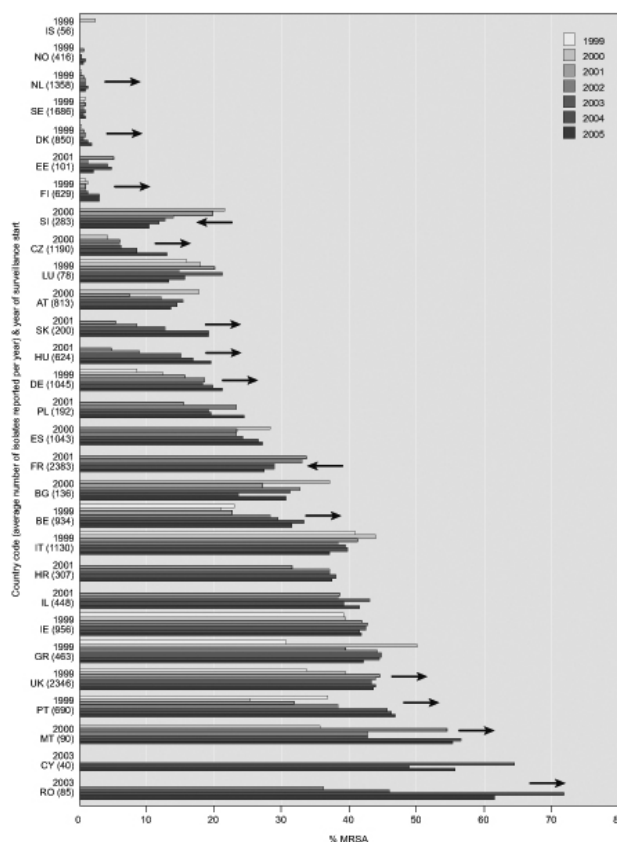


Abb.1: MRSA Entwicklung 1999-2005 in Europa nach Ländern geordnet. Die Pfeile einen signifikanten Trend an. (EARSS Annual report 2005)

Im Bereich der Gram- negativen Bakterien ist ebenfalls eine deutliche Zunahme multiresistenter Isolate zu verzeichnen. Die damit verbundenen Auswirkungen betreffen mit einer Zunahme der Mortalität, Verlängerung der Liegezeit und Limitation der antimikrobiellen Therapieoptionen nicht nur den Krankheitsverlauf des einzelnen Patienten, sondern stellen durch den erhöhten Aufwand bei der Pflege und Therapie einen erheblichen Kostenfaktor im Gesundheitswesen dar.

Seit der Entdeckung des Penicillins im Jahr 1928 durch Fleming ¹⁷ und dem Beginn des weltweiten Einsatzes verschiedener Betalaktamantibiotika-Derivate wurde die Fähigkeit der Mikroorganismen zu einer Resistenzausbildung beobachtet, bei der verschiedene Resistenzmechanismen auftreten. Nur durch ein Verständnis der Wechselwirkung aller an dieser Entwicklung beteiligten Faktoren kann es gelingen, die Entstehung und Verbreitung von Resistenz zu unterbinden und damit die Wirksamkeit der antimikrobiellen Therapie aufrecht zu erhalten.

1.2 Nosokomiales Erregerspektrum

1.2.1 Enterobacteriaceae

Die Enterobacteriaceae bilden vor allem im Bereich der Intensivstation einen wesentlichen Bestandteil der endogenen Besiedlungsflora von Patienten und führen häufig zu Infektionen wie postoperativen Wundinfektionen, Beatmungs-assoziierten Pneumonien und Harnwegsinfektionen. Sie bestehen aus mehr als 30 Gattungen, die wiederum in weit über 100 Spezies unterteilt werden können. Neben den in Deutschland mittlerweile selten vorkommenden Krankheiten, wie z.B. Typhus, Ruhr u.a. gewinnen vor allem opportunistische Erreger unter den Enterobacteriaceae zunehmend an Bedeutung. Eine vermehrte Hospitalisierung vor allem immer älterer Patienten, der extensive Einsatz von Antibiotika im Rahmen eines stationären Aufenthaltes, der damit einhergehende Selektionsdruck und die nosokomiale Transmission solcher Erreger führen dazu, dass etwa 40-50% aller nosokomialen Infektionen von Enterobacteriaceae verursacht werden. (http://www.rki.de/cln_011/nn_226782/DE/Content/Infekt/Krankenhaushygiene/Nosokomiale__Infektionen/nosokomiale__infektionen__node.html__nnn=true)

1.2.2 Vorkommen der Enterobacteriaceae

Das natürliche Habitat dieser Bakterien ist der Darmtrakt von Mensch und Tier. Darüber hinaus kommen sie auch in der Umwelt, insbesondere im Wasser, Boden und zum Teil auch als Krankheitserreger bei Pflanzen vor.

1.2.3 Einteilung der Enterobacteriaceae

Allen Arten sind die Stäbchenform, das gramnegative Färbeverhalten, das fakultativ anaerobe Wachstum, die Glukosefermentation sowie die Nitratreduktion gemeinsam. Zur endgültigen Differenzierung der einzelnen Spezies werden biochemische Eigenschaften (siehe Material und Methoden) zugrunde gelegt.

Eine klinische Einteilung unterscheidet zwischen fakultativ und obligat pathogenen Erregern. Zu den obligat pathogenen Bakterien gehören die pathogenen *E.coli* (EPEC, ETEC, EIEC, EHEC), sowie einige *Salmonella*-, *Yersinia*-, und *Shigella*-Spezies.

Die wichtigsten Vertreter der fakultativ pathogenen Erreger finden sich in den Gattungen: *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Morganella*, *Escherichia coli* und *Providencia*. In der Regel verursachen diese Bakterien nur dann Erkrankungen, wenn sie aus ihrem natürlichen Reservoir in andere Körperregionen verschleppt werden und bei dem Patienten zusätzliche Risikofaktoren, wie z.B. konsumierende Erkrankungen, Mangelernährung, COPD (Chronisch obstruktive Pulmonale Erkrankung), Immunsuppressionstherapie usw. vorliegt¹⁴. Zu den aus einer Infektion mit fakultativ pathogenen Enterobacteriaceae resultierenden Erkrankungen gehören: Pneumonien, Wundinfektionen, Sepsis, Meningitiden/Enzephalitiden, Harnwegsinfektionen, Endokarditiden und andere Erkrankungsbilder.

1.2.4 Resistenzmechanismen bei Gram-negativen Bakterien

Mutationen im bakteriellen Chromosom können im Allgemeinen zur Resistenz gegenüber nur einem Antibiotikum führen¹⁷. Sehr selten (bei einer Mutationsfrequenz von z.B. 10^{-6} für ein Gen und 10^{-12} für zwei Gene) treten hingegen Mutationen auf, die zur chromosomal vermittelten Resistenz gegenüber zwei Antibiotika mit verschiedenen Resistenzmechanismen führen. Die chromosomale Resistenz bleibt zumeist beschränkt auf das Bakterium, in dem das

Mutationsereignis eingetreten ist und auf dessen folgende Generationen (vertikale Resistenzweitergabe).

Durch die Übernahme von Resistenzgenen können auch Bakterien anderer Keime die Antibiotikaresistenzen erwerben (horizontale Resistenzweitergabe). Die Aufnahme von DNA geschieht in Form von Plasmiden, Transposons und anderen mobilen genetischen Elementen. Dies verschafft den Bakterien in der Krankenhausumgebung einen Selektionsvorteil, da zusätzliche Antibiotikaresistenzgene aufgenommen werden können, die bei häufiger Antibiotikagabe einen Selektionsvorteil für die Erreger bedeuten.

Ein Transfer kann durch Aufnahme von DNA ohne Zellkontakt, entweder in freier Form (Transformation) oder als Teil eines Bakteriophagenoms (Transduktion) bzw. bei Zellkontakt (Konjugation) erfolgen².

1.3 Integrone

1.3.1 Aufbau von Integrone

Anfang der 80er Jahre entdeckten Untersucher mehrerer Arbeitsgruppen unter Verwendung von Heteroduplex-Analysen und Restriktionsmethoden, dass bei verwandten, potentiell transferierbaren Genstrukturen wie Plasmiden und Transposons verschiedene Antibiotikaresistenzgene zum Teil in identischer Lokalisation nachweisbar sind^{46,64,71,78}. Nach der Sequenzierung der kodierenden Genomabschnitte zeigte sich, dass eine Vielzahl von den identischen Basenpaarabfolgen flankiert wurden. Dies legte die Vermutung nahe, dass diese Resistenzgene in Form von so genannten „Gen“- oder „Insertionskassetten“ als Bestandteil einer einheitlichen Struktur anzusehen sind^{6,29,50,51}. Diverse Resistenzgene konnten inzwischen als Bestandteil von Resistenzgenkassetten identifiziert werden²⁵. Dabei zeigte sich, dass vielfach solche Kassetten als Bestandteil einer bestimmten Region großer mobiler genetischer Einheiten anzutreffen sind^{25,68}. Hierfür wurde von Stokes und Hall der Begriff „Integron“ eingeführt⁶⁸.

Das folgende Modell nach Levesque³⁷ soll die strukturellen Zusammenhänge von Integrone veranschaulichen (s.Abb2):

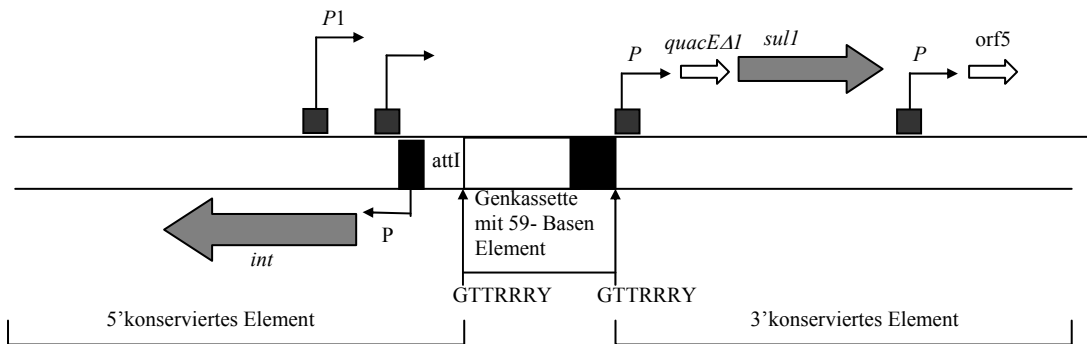


Abb.2:

Typische Struktur eines Integrons der Klasse 1; *attI*: Attachment region; P, P1-P2: Promotoren; *quacEAI*, *sulI*: typische Resistenzgene im Bereich der 3' Conserved Sequence (CS); *orf5*: Open reading frame 5; *int*: Integrase; Modifiziert nach Levesque³⁶. Weitere Erläuterungen: s.Kap. 1.3.3.

Jedes Integrone besitzt eine spezifische Proteinstruktur, die zur Einteilung in verschiedene Integroneklassen herangezogen wird. Diese so genannte Integrase katalysiert die ortsspezifische Rekombination von Resistenzgenkassetten^{40,41}. Genkassetten können mit Hilfe dieser Enzyme in ein Integrone eingefügt oder daraus entfernt werden^{5,8-10}. Daher wurde als grundlegende Voraussetzung für die Verwendung der Bezeichnung Integrone festgelegt, dass der entsprechende Genomabschnitt eine spezifische Rekombinationsschnittstelle einschließlich der Integrase für den Einbau von Insertionskassetten aufweist und somit über die Enzymausstattung verfügt, verschiedene Resistenzgene zu binden bzw. wieder aus dem Verbund auszuschleusen^{8,10,68}. Basierend auf Homologievergleichen der verschiedenen Integrase-Gene, deren entsprechende Translationsprodukte eine 45- bis 58-prozentige Übereinstimmung der Aminosäuresequenz aufweisen, werden heute vier unterschiedliche Klassen von Resistenz-Integrone definiert⁶².

In der Theorie spielen bei der Verbreitung von Antibiotikaresistenzen zwei sich ergänzende Mechanismen eine Rolle: Zum einen handelt es sich dabei um den bereits oben erwähnten Genkassettentransfer, zum anderen scheint die Struktur, in die Resistenzgene integriert werden, ebenfalls mobil zu sein, da diese in diversen unabhängigen Lokalisationen in unterschiedlichen Plasmiden und Transposons nachweisbar sind^{29,68}.

1.3.2 Resistenzgene / Genkassetten

Sowohl bei Resistenz- Integrons als auch bei so genannten Super-Integrans existiert eine variable Genkassetten-Region, die ein oder mehrere Resistenzgene enthalten kann. Hier liegt der wesentliche Unterschied zwischen Resistenz-Integrans und Super-Integrans, da erstere auf bis zu 8 Resistenzgene in der Genkassettenregion limitiert sind, während Super-Integrans bis zu 179 solcher Gene akquirieren können. Bei Genkassetten handelt es sich um mobile Einheiten ⁴¹, die entweder frei als ringförmige DNA-Moleküle ¹⁰, oder - nach Insertion - innerhalb eines aufnehmenden Integrans nachweisbar sind ⁹ (s.Abb.3).

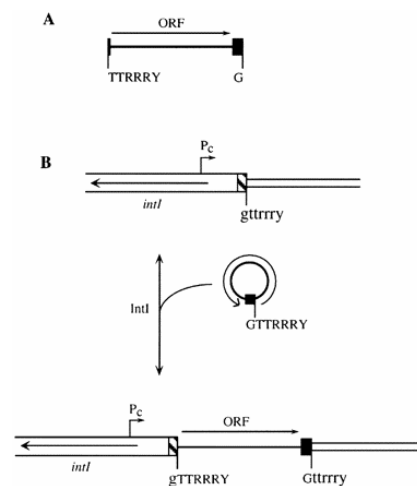


Abb.3:

(A) Eine Genkassette in linearisierter Form mit einem ORF, gewöhnlich einem Antibiotikaresistenzgen. Das 59 BE (siehe 1.3.3. oben) ist als schwarzes aufgespaltenes Quadrat mit der 7 bP langen Core-Sequenz GTTRRRY dargestellt.

(B) Die Insertion einer ringförmigen Genkassette in ein Integrin. *intI* : Integrasegen, *P_c* : Promoter, der die Transkription der eingebauten Genkassette einleitet (auch *P_{ant}* genannt), die integrinassoziierte Rekombinationsschnittstelle *attI* mit der Core-Sequenz gttrry ist quergestreift dargestellt. (Aus ²⁸)

Damit unterscheiden sie sich von einer Vielzahl anderer transponierbarer DNA-Elemente, da sie weder enzymkodierende Abschnitte für die Translokation, noch für die Expression der enthaltenen Gene besitzen und somit ohne das Integrin nicht in der Lage sind, den Resistenz-Phänotyp des Empfängers zu verändern.

Auf Basis der Integrindefinition durch Hall und Collis ²⁷ sind Genkassetten daher nur dann formaler Bestandteil eines Integrans, wenn sie in gebundener Form im Bereich der spezifischen Insertionsregion des Integrans angetroffen werden.

1.3.3 Rekombinationsschnittstellen

Die Genkassetten-Region wird von je einem konservierten Segment an jedem Ende flankiert⁶⁸. Untersuchungen von klinischen Integron-haltigen Isolaten zeigten allerdings, dass der Aufbau dieser Region variieren kann^{26,55}. Bisher wurden sechs ORF (Open Reading Frames), Sequenzabschnitte, denen bisher keine Funktion zugeordnet werden konnte, aus dieser Region veröffentlicht.

Integrans verfügen über eine, als „59-Basen-Element“ (s. Abb. 2) bezeichnete, Region mit der Funktion einer spezifischen Anheftungsstelle⁵⁰. Diese Rekombinationsschnittstelle der Resistenzgene bindet an eine passende spezifische Anheftungssequenz innerhalb der oben beschriebenen Genkassetten. Die wirtsseitige Schnittstelle (*Attachment region*) wurde von Recchia *et al.* als *attI* bezeichnet⁵⁷.

1.3.4 Integrasen und Integronklassen

Bisher wurden vier Integronklassen beschrieben, die sich anhand der Aminosäuresequenzen ihrer Integrasen unterscheiden (Tab.1).

Integrasklassen	Aminosäureidentität (%)
IntI1 – IntI3	59
IntI2 – IntI3	46
IntI1 – IntI2	46
IntI2 – IntI4	48

Tab.1: Aminosäureidentitäten einzelner Integrasklassen
(aus^{30,31})

Das Integraseenzym katalysiert den Insertionsgenkassetten Ein- und Ausbau^{28,41,58}. Klasse 1 Integrans werden am häufigsten in klinischen- und Umweltisolaten aus der Familie der *Enterobacteriaceae* und anderen gramnegativen Bakterien nachgewiesen²². Auch bei multiresistenten Bakterien lassen sich überwiegend Klasse-1-Integrans nachweisen, daher wird Ihnen auch die größte klinische Bedeutung zuerkannt. Das 3'-CS der Klasse 1 Integrans beinhaltet üblicherweise die Gene *qacEA*, *sulI* und ORF5 (s.Abb.2). Das Gen *qacEA* vermittelt Resistenz gegenüber quaternären Ammoniumverbindungen, die Bestandteil von quaternären Desinfektionsmitteln sind, *sulI* bewirkt Resistenz gegenüber dem Sulfonamid Sulfamethoxazol.^{27,42} Klasse 1 Integrans sind häufig auf Derivaten des Transposons Tn5090

wie z.B. Tn21 lokalisiert³⁰. Häufig sind sie auch mit Resistenzgenkassetten assoziiert, unter denen die Resistenzgene aus der Familie *aadA* vorherrschend sind, welche Resistenz gegenüber den Aminoglykosiden Streptomycin und Spektinomycin vermitteln⁴².

Genkassetten, deren exprimierte Proteine eine Resistenz gegenüber Trimethoprim und Betalaktamantibiotika vermitteln, sind ebenfalls häufig bei Klasse 1 Integrans beschrieben worden²¹.

Klasse 2 Integrans sind gewöhnlich mit dem Transposon Tn7 und dessen Derivaten assoziiert und tragen häufig in der 3' Region des Integrases die Antibiotikaresistenzgene *dfrA1*, *sat* und *aadA1*^{69,70}, die Resistenz gegenüber Trimethoprim¹⁹, Streptothricin⁷⁰ und Streptomycin/Spektinomycin¹⁸ vermitteln. Klasse 2 Integrans wurden in klinischen Isolaten von *Acinetobacter*^{24,23}), *Shigella*⁴⁵ und *Salmonella*⁴⁹ beschrieben. Die Klasse-2-Integrase trägt ein internes Stop-Codon und ist somit theoretisch inaktiv. Das Stop-Codon lässt darauf schließen, dass die Integrase 2 ein Pseudogen ist.

Die Integrase 1 ist effizienter und weniger spezifisch als Integrase 2, daher gibt es eine größere Diversität von Genkassetten auf Klasse 1 Integrans im Gegensatz zu der begrenzten Genkassettenvariabilität in Klasse 2 Integrans³⁰.

Integrans der Klasse 3 wurden bisher selten in klinischen Isolaten von *P.aeruginosa*, *S.marcescens*, *A.xyloxydans*, *P.putida* und *K.pneumoniae* aus Japan nachgewiesen und ähneln in ihrer Struktur Klasse 2 Integrans^{1,12,13,67}.

Klasse 4 Integrans wurden in diversen *Vibrio cholerae*-Stämmen identifiziert^{7,12} und werden aufgrund der Anordnung von bis zu 179 Genkassetten als Superintegrans bezeichnet. Innerhalb der Genkassetten wurden nur wenige Antibiotikaresistenzgene nachgewiesen³², so dass von einer Rolle der Integrans und Genkassettenssysteme bei der Entwicklung des bakteriellen und Plasmid-Genoms ausgegangen wird¹².

Multiple Integransklassen pro Isolat wurden bei verschiedenen *Enterobacteriaceae* beschrieben, wobei die Kombinationen bisher auf Klasse 1 und 2 Integrans beschränkt blieben. In diesen Fällen lag eine Resistenz gegenüber mindestens fünf Antibiotikaklassen vor²².

1.3.5 Beitrag von Integrans zur Resistenzentwicklung

Bis heute wurden über 110 Integron-assoziierte Genkassetten beschrieben^{20,21} die unter anderem Resistenz gegenüber einer Vielzahl von Antibiotikaklassen wie z.B. Aminoglykosiden, Betalaktamen, Chloramphenicol, Erythromycin und Sulfonamiden, sowie (in Einzelfällen sogar) gegenüber Desinfektionsmitteln, wie quaternären Ammoniumverbindungen vermitteln⁵⁷.

1.3.6 Entstehung neuer Resistenzphänotypen

Genkassetten können bei der Integration miteinander fusionieren⁴ woraus sich Änderungen des resultierenden Resistenzphänotyps ergeben können. So konnte erwiesen werden, dass es bei einer Fusion des *aac(3)-IB* Gen, das eine Resistenz gegenüber Gentamicin bewirkt mit dem *aac(6)-Ib'* Gen, welches eine Resistenz gegenüber Gentamicin und Amikacin kodiert, zur Ausbildung eines neuen Gens (*aac(3)-IB / aac(6)-Ib'*) kommt. Dieses Gen kodiert in dieser Form nur für eine High-Level-Gentamicinresistenz. Die Resistenz gegenüber Amikacin ist verloren gegangen.

1.3.7 Konservierung bestehender Resistenzen bei nachlassendem Antibiotika-selektionsdruck

Die Mehrzahl von Studien zur Resistenzentwicklung geht von der Hypothese aus, dass zwischen der Verwendung von Antibiotika und der konsekutiven Resistenzentwicklung ein kausaler Zusammenhang besteht. Es erscheint daher logisch, dass bereits kurzzeitige Reduktion des Antibiotikaselektionsdruckes, wie z.B. im Konzept der „Cycling Antibiotics“ im Rahmen von Studien belegen konnte, zu einer Durchsetzung sensibler Bakterienpopulationen führen kann. Dennoch lässt sich beobachten, dass bestimmte Resistenzphänotypen trotz nachlassender Verwendungshäufigkeit der entsprechenden antimikrobiellen Substanzen persistieren.

Dieses Phänomen ist mit Hilfe eines Darwinistischen Resistenz-Modells allein, das von der Idee eines Antibiotika-Selektionsdruckes ausgeht, nicht zu erklären. Integrans bieten an dieser Stelle eine Erweiterung des Denkmodells: Setzt man einen präexistenten Resistenzgen-Pool

voraus, der das Ergebnis einer seit Jahrtausenden andauernden Exposition der Bakterien gegenüber natürlich vorkommenden Antibiotika darstellt, sind mobile genetische Elemente wie Integrons imstande, diese Resistenz zu vermitteln. Die Entdeckung der „ancestral chromosomal super-integrons“ (SIs) erbrachte den entscheidenden Beleg für die Bedeutung des Integron-Systems als maßgeblicher Faktor im Evolutionsverlauf diverser Bakterienspezies^{59,61}.

In den Untersuchungen dazu wurde ein neuer, innerhalb des chromosomalen *V.cholerae*-Genoms lokalisierter Typ von Integron entdeckt, für den der Begriff „Super-Integron“ (SI) geprägt wurde⁴⁴. Diese SI-Region ist 126 Kilobasenpaare groß und beherbergt 214 ORFs^{32,60}. Bei der systematischen Suche nach gleichartigen SI-Strukturen wurde deren Bedeutung als eine entwicklungsgeschichtliche alter und unter den Bakterien weit verbreiteter Mechanismus zur Akquisition neuer Gene bzw. adaptive Funktionen belegt^{60,73}.

In klinische Studien der letzten Jahre wurde eine weite Verbreitung von Resistenzintegrons bei *Enterobacteriaceae*-Stämmen aus europäischen Krankenhäusern belegt, sowie eine Assoziation mit Resistenzen gegenüber mehreren Antibiotikaklassen^{20,33,42,43,63}. Diese Beobachtungen führten zur Detektion des so genannten „Multi-resistance-integron“ (MRI), dessen Vertreter eine Anzahl von bis zu acht unterschiedlichen kassettenassoziierten Resistenzgenen aufweisen⁴⁷.

Bei den SIs handelt es sich offensichtlich um eine entwicklungsgeschichtlich ältere Struktur des Bakteriengenoms, so dass vieles auf deren Bedeutung als mögliche Vorstufe des MRIs hinweist. Durch die hohe Übereinstimmung der assoziierten Integrasen wird diese Hypothese gestützt.

1.3.8 Integronepidemiologie

Nur wenige Studien haben bisher die Verbreitung von Integrons untersucht. In einer der ersten Untersuchungen von Sallen *et al.* wurden insgesamt 49 Isolate, die aus einem Ort in Frankreich stammten, systematisch auf das Vorhandensein von Integrons untersucht⁶³. Insgesamt 59 Prozent der sechs unterschiedlichen *Enterobacteriaceae*-Spezies enthielten Integrons. Einige dieser Bakterien enthielten sogar mehrere Integrons.

Eine Studie aus Chile untersuchte 100 *Acinetobacter baumannii* und fand unter den 59 Isolaten, die dem Biotyp 9 zuzuordnen waren, 81,4% integronhaltige Stämme. Der Integronanteil der Isolate mit anderen Biotypen schwankte zwischen 0 und 16,7%.

In den Krankenhäusern dieser Region hat der Biotyp 9 die höchste Prävalenz und erwies sich als resistenter gegenüber einer Vielzahl von Antibiotika. Dieser Biotyp war damit resistenter als alle anderen Gruppen von *Acinetobacter baumannii* ²⁴.

Die Integrone der Klasse 1 wurden in einer Untersuchung von Schmitz *et al.* in Isolaten aus Blutkulturen gefunden ⁶⁵. Die 278 konsekutiv untersuchten Erreger aus Blutkulturen gehörten zu insgesamt elf unterschiedlichen Gram-negativen Spezies. Bei dreizehn Prozent der untersuchten Isolate konnten 1- 3 Integrone der Klasse 1 nachgewiesen werden. Die Integrone traten bei sechs unterschiedlichen Spezies auf.

Jones *et al.* untersuchten in den Niederlanden 135 Stämme, die sieben unterschiedlichen *Enterobacteriaceae*-Spezies zuzuordnen waren ³³. Mehr als die Hälfte davon trugen ein Integron. Bemerkenswert ist aber nicht nur die hohe Prävalenz von Integrone, sondern auch die große Anzahl von Isolaten, die mehrere Integrone trugen. Ähnliche Ergebnisse erbrachte eine Untersuchung von 163 Stämmen aus neun Ländern mit insgesamt 13 unterschiedlichen Spezies von Gram- negativen Bakterien ⁴², 42% dieser Isolate trugen ein Integron. Diese Studie konnte auch zeigen, dass integronhaltige Isolate häufiger eine Resistenz gegenüber mehr Antibiotika auszubilden als Integron-freie Isolate.

Unter 37 in Italien untersuchten Isolaten von Enteritis-(„*Salmonella enterica*“) Salmonellen einer pädiatrischen Station wurden Integrone aller vier Klassen gefunden. Diese wurden von 3 Plasmiden, pZM61-63 übertragen. Bemerkenswert ist hierbei nicht nur, dass die Resistenz gegenüber Ampicillin, Chloramphenicol, Streptomycin, Sulfonamiden und Gentamicin integronvermittelt war, sondern einzelne Genkassetten (aadA1a) sowohl in Integrone der Klasse 3 als auch in denen der Klasse 2 gefunden wurden. In Klasse 3 verhalten sich die Resistenzgene aber stumm, während sie in Klasse 2 exprimiert werden. Als Erklärung für dieses Phänomen wurde von Recchia *et al.* der unterschiedliche Abstand des Gens zum Promotor angeführt ⁵⁷. Andere Untersucher konnten bestätigen, dass der Promotor P_{ANT} in Integrone der Klasse 3 zwanzigmal aktiver ist als in den beiden anderen Klassen ¹¹.

In einer weiteren Untersuchung charakterisierten Wunder *et al.* das Antibiotikaresistenzverhalten von 406 integronhaltigen und 293 integronfreien *Enterobacteriaceae* aus 24 europäischen Universitätskliniken. Dabei waren integronhaltige

Isolate signifikant resistenter gegenüber Ampicillin, Ticarcillin, Piperacillin, Ceftazidim, Gentamicin, Trimethoprim-Sulfamethoxazol und Ciprofloxacin.

Während der Beitrag von Integrons zu einer Resistenzentwicklung somit aus evolutionsgenetischer und epidemiologischer Sicht gut untersucht ist, ist bisher wenig darüber bekannt, unter welchen Bedingungen Integrons in der Krankenhausumgebung die Resistenzentwicklung beeinflussen. Vorarbeiten zu diesem Thema (Schmitz et al, Hygiene&Medizin) konnten anhand von Blutkultur-Isolaten Gram-negativer Bakterien der Universitätsklinik Düsseldorf zeigen, dass Multiresistenzintegrons vor allem im Bereich der Intensivstationen gehäuft auftraten und dass sich innerhalb eines Zeitraumes von 4 Jahren ihr Anteil nahezu vervierfacht hat. Zielsetzung dieser Untersuchung war es daher, die Ursachen und Hintergründe dieser Verbreitung im Rahmen einer zeitlich limitierten Beobachtung auf einer Intensivstation zu verfolgen.

1.4 Fragestellung

In einem Beobachtungszeitraum von sechs Wochen sollte untersucht werden, welche Umgebungsbedingungen im Bereich der chirurgischen Intensivstation der Universitätsklinik Düsseldorf einen Einfluss auf das Integron vermittelte Resistenzverhalten bei Gram-negativen Erregern ausübte. Hierfür sollten alle Gram-negativen Bakterienspezies, die sich als Kolonisationsflora und auch als Erreger nosokomialer Infektionen isolieren ließen auf das Vorliegen von Integrons der Klassen 1 und 2 untersucht werden. Weiterhin sollten alle verfügbaren klinisch-infektiologischen Parameter einschließlich der verabreichten Antibiotikagaben dokumentiert werden. Nach einer biochemischen Differenzierung der vorliegenden Bakterienspezies sollte der Resistenzphänotyp gegenüber den wichtigsten Betalaktamantibiotika ermittelt werden. Diese Informationen dienten in Form von kasuistischen Zusammenstellungen der Analyse des Zusammenhanges zwischen verschiedenen patientenseitigen und umgebungsbezogenen Einflussfaktoren der intensivmedizinischen Therapie und dem Vorliegen von Integrons.

2. Material und Methoden

2.1 Untersuchungsmaterial und Probenentnahme

Die Materialentnahme erfolgte im Rahmen eines auf der Station etablierten Screeningprogrammes und wurde vom medizinischen Personal vorgenommen. Nach Ausstrich der Materialien auf Müller-Hinton Agar ohne Blutzusatz, standen die Kulturproben zur Selektion und Differenzierung Gram-negative Bakterienspezies zur Verfügung. Folgende Materialien wurden untersucht: Sputum, Wundabstriche, Katheterspitzen, Blutkulturen, Stuhlproben, Urinproben, Drainageflüssigkeit.

2.2 Datenerhebung

2.2.1 Einleitung

Unsere Daten wurden im Zeitraum vom 01.04.2003 und dem 15.05.2003 auf einer Intensivstation der Universitätsklinik Düsseldorf erhoben. Dabei wurden nur Patienten in die Studie aufgenommen, die voraussichtlich über einen längeren Zeitraum als 24 Stunden stationär waren. Insgesamt konnten 59 Patienten in die Studie eingeschlossen werden

Das erste Ziel unserer Datenerhebung war die Erfassung des klinischen Zustandes der Patienten. So mussten sowohl die immunologischen als auch infektiologische Parameter erfasst werden. Hierbei wurden neben den infektiologischen Blutwerten (Leukozytenzahl, CRP) der Patienten unter anderem 3 Scores erhoben. Um den patientenbezogenen Selektionsdruck, dem die Bakterien ausgesetzt waren, zu quantifizieren wurde die tägliche Antibiotikadosis dokumentiert und anschließend in „Daily Defined Dosis“ (DDD) umgerechnet.

2.2.2 APACHE II (Acute Physiology And Chronic Health Evaluation)

Der erste verwendete Score war der APACHE II ³⁴. Hierbei handelt es sich um einen Score der eine Aussage über die Sterbewahrscheinlichkeit eines Patienten macht. Die folgenden Parameter wurden verwendet und den angegebenen Punktwerten zugeordnet:

Alter des Patienten [Jahre]

Punkte	0	2	3	5	6
Alter	≤ 44	45 - 54	55 - 64	65 - 74	≥ 75

Temperatur [Grad Celsius]

	4	3	2	1	0	1	2	3	4
Körperkerntemperatur [°C]	≥ 41,0	39,0 - 40,9		38,5 - 38,9	36,0 - 38,4	34,0 - 35,9	32,0 - 33,9	30,0 - 31,9	≤ 29,9

Herzfrequenz [Schläge pro Minute]

	4	3	2	1	0	1	2	3	4
Herzfrequenz [1/min]	≥ 180	140 - 179	110 - 139		70 - 109		55 - 69	40 - 54	≤ 39

Mittlerer arterieller Druck (MAP)[mmHg]

	4	3	2	1	0	1	2	3	4
MAP [mm Hg]	≥ 160	130 - 159	110 - 129		70 - 109		50 - 69		≤ 49

Atemfrequenz [Atemzüge pro Minute]

	4	3	2	1	0	1	2	3	4
Atemfrequenz (spontan/maschinell)	≥ 50	35 - 49		25 - 34	10- 24	10-11	6-9		≤ 5

Sauerstoffsättigung [%]

	4	3	2	1	0	1	2	3	4
Oxygenierung									
a) FIO₂ ≥ 0,5: AaDO₂	≥ 500	350 - 499	200 - 349		< 200				
b) FIO₂ < 0,5: PaO₂					> 70	61 – 70		55 - 60	< 55

Blut-pH

	4	3	2	1	0	1	2	3	4
arterieller pH	≥ 7,70	7,60 - 7,69		7,50 - 7,59	7,33 - 7,49		7,25 - 7,32	7,15 - 7,24	< 7,15

Leukozytenzahl [l/mm³]

	4	3	2	1	0	1	2	3	4
Leukozyten [l/mm³] (* 1 000)	≥ 40		20,0 - 39,9	15,0 - 19,9	3,0 - 14,9		1,0 - 2,9		< 1,0

Natrium [im Serum; mmol/l]

	4	3	2	1	0	1	2	3	4
Serum Natrium [mmol/L]	≥ 180	160 - 179	155 - 159	150 - 154	130 - 149		120 - 129	111 - 119	≤ 110

Kalium [im Serum; mmol/l]

	4	3	2	1	0	1	2	3	4
Serum Kalium [mmol/l]	≥ 7,0	6,6 - 6,9		5,5 - 5,9	3,5 - 5,4	3,0 - 3,4	2,5 - 2,9		< 2,5

Kreatinin [im Serum; mg/dl]

	4	3	2	1	0	1	2	3	4
Krea_{Serum} [mg/dl]	≥ 3,5	2 - 3,4	1,5 - 1,9		0,6 - 1,4		< 0,6		

Hämatokrit [%]

	4	3	2	1	0	1	2	3	4
Hämatokrit [%]	≥ 60		50,0 - 59,9	46,0 - 46,9	30,0 - 45,9		20,0 - 29,9		< 20

Glasgow-Coma-Scale (GCS)

	1	2	3	4	5	6
Augenöffnen	gar nicht	auf Schmerzreiz	auf Aufforderung	spontan		
Motorik	keine	Streckmechanismen	Beugemechanismen	ungezielt auf Schmerz	gezielt nach Schmerz	gezielt nach Aufforderung
Verbal	keine	unverständliche Laute	inadäquate Reaktion	Patient desorientiert, beantwortet Fragen	Patient orientiert	

Score = 15- GCS-Wert

Gesundheitspunkte:

- a. anamnestisch schwere Organinsuffizienz eruierbar oder Patient immunkompromittiert, z. B. Leberzirrhose, portale Hypertonie, obere GI-Blutung, Enzephalopathie, New York Heart Association (NYHA) -Klasse IV, schwere Ateminsuffizienz, schwere pulmonale Hypertonie (> 40 mm Hg), sekundäre Polyzytämie, Dialysepflichtigkeit, immunsuppressive Therapie, Chemotherapie, Bestrahlung, hohe Steroiddosen, Leukämie, AIDS

5 Punkte

- b. elektive postoperative Patienten

2 Punkte

Die Einzelwerte wurden addiert und mit dem Ergebnis wird wie folgt verfahren:

Sterbewahrscheinlichkeit [R]:	
	-3,517
	+ APACHE-Score * 0,146
	+ 0,603 (nur bei postoperativen Notfalleingriffen)
	+ Risikofaktor
A =	
$R = 100 * [(exp^A) / (1 + exp^A)] =$	%

Bei dem **Risikofaktor** es handelt sich um einen speziellen Wert, dem eine Erkrankung unter der der Patient bei Aufnahme leidet bzw. einem speziellen Organsystem, dass die Hauptlokalisation des Einweisungsgrundes darstellt, zugeordnet ist.

2.2.3 Clinical Pulmonary Infection Score (CPIS)

Der zweite verwendete Score ist der Clinical Pulmonary Infection Score (CPIS) ⁵⁴. Hierbei wurden die folgenden Parameter erhoben:

Temperatur [Grad Celsius]

- (0) ≥ 36.1 und ≤ 38.4
- (1) ≥ 38.5 und ≤ 38.9
- (2) ≥ 39.0 und ≤ 36.0

Leukozytenzahlen [l/mm³]

- (0) ≥ 4000 und ≤ 11000
- (1) < 4000 oder > 11000

tracheale Sekretionsmenge

- (0) wenig
- (1) mittel
- (2) viel

tracheale Sekretkonsistenz

- (0) normal
- (1) purulent

Quotient aus Sauerstoffpartialdruck (PaO₂) und Sauerstoffsättigung (FiO₂) [mmHg]

- (0) ≥ 240 oder Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS)
- (2) ≤ 240 und kein ARDS

Röntgenbild

- (0) kein Infiltrat
- (1) fleckiges oder diffuses Infiltrat
- (2) lokalisiertes Infiltrat

Hierbei konnten Werte von 0 bis 10 erreicht werden. Der resultierende Wert korreliert mit der Schwere der Atemwegsinfektion.

2.2.4 Sepsis-related Organ Failure (SOFA)

Hierbei wurden folgende Parameter erhoben⁷⁶:

Quotient aus PaO₂/FiO₂ [mmHg] (Atmung)

- (0) ≥ 400
- (1) < 400
- (2) < 300
- (3) < 200
- (4) < 100

Thrombozytenzahl [1000/mm³] (Koagulation)

- (0) ≥ 150
- (1) < 150
- (2) < 100
- (3) < 50
- (4) < 20

Bilirubin [mg/dl] (Leber)

- (0) < 1.2
- (1) 1.2 - 1.9
- (2) 2.0 - 5.9
- (3) 6.0 - 11.9
- (4) > 12.0

Blutdruck (Kardiovaskuläres System)

- (0) MAP > 70 mmHg
- (1) MAP < 70 mmHg
- (2) Dopamin ≤ 5 or Dobutamin (dosisunabhängig)
- (3) Dopamin 5-15 or Nor-/Epinephrin ≤ 0.1
- (4) Dopamin > 15 or Nor-/Epinephrin > 0.1

Glasgow-Coma-Scale (ZNS)

- (0) 15
- (1) 13-14
- (2) 10-12
- (3) 6-9
- (4) <6

Kreatinin [mg/dl] (Niere)

- (0) < 1.2
- (1) 1.2 - 1.9
- (2) 2.0 - 3.4
- (3) 3.5 - 4.9
- (4) >5.0

Der Maximal erreichbare Wert des Scores beträgt 24 und korreliert mit dem Krankheitsgrad des Patienten.

2.2.5 Antimikrobielle Therapie

Um den patientenbezogenen, antimikrobiellen Selektionsdruck, dem die isolierten Bakterien ausgesetzt waren, zu erfassen und zu quantifizieren, wurde für jedes Antibiotikum die täglich verabreichte Antibiotikadosis dokumentiert und anschließend in „Daily Defined Dosis“ (DDD) umgerechnet (<http://www.whocc.no/atcddd/>). Unter Bezugnahme auf die Liegezeit der Patienten wurde darüber hinaus der auf der Gesamtstation vorherrschende überindividuelle Selektionsdruck für jedes dokumentierte Antibiotikum in Form von DDDs pro 1000 Patiententage ermittelt.

2.2.6 Zusätzliche Parameter / Daten

Unter anderem wurde dokumentiert, ob eine Sepsis oder Pneumonie in der ärztlichen Dokumentation erfasst war. Neben den schon bei den Scores erfassten Leukozytenzahlen und der Temperatur wurde das C-reaktive Protein (CRP) [mg/dl] als weiterer infektiologischer Parameter erfasst, um eine noch bessere Information über den infektiologischen Zustand des Patienten zu bekommen. Darüber hinaus wurden alle invasiven Maßnahmen in die Datenbank aufgenommen (Harnwegskatheter, Dialyse, Endotrachealtubus, arterielle Kanülen, zentralvenöse Zugänge, periphervenöse Zugänge, Drainagen inklusive der jeweiligen Lokalisation) um möglichen Eintrittspforten nosokomialer Infektionen zu erfassen

2.3 Mikrobiologische Untersuchung des klinischen Untersuchungsmaterials

Aus den auf Blutplatten ausgestrichenen Mischkulturen des Probenmaterials wurden alle Gram-negativen Bakterien isoliert und in Form von 3-Ösenausstrichen Reinkulturen auf Blutagar hergestellt. (**Typische Zusammensetzung [g/Liter]**: Nährsubstrat (Hefeextrakt, Peptone, Leberhydrolysat) 23,0; Natriumchlorid 5,0; Agar-Agar 12,0 / **Zubereitung**: 40 g in 1 Liter Wasser lösen und autoklavieren (15 Min. bei 121°C). Nach dem Abkühlen auf 45-50°C 5-8% steriles defibriniertes Blut ohne Blasenbildung einmischen, Platten gießen (pH: $7,4 \pm 0,2$ bei 25 °C). Die Nährböden wurden anschließend für 24 Stunden bei 36°C bebrütet. Anschließend wurden die jeweiligen Reinkulturen in Mikrobänken bei -70° C aufbewahrt.

2.4 Selektion der Gram-negativen Bakterien

Um von den Kulturplatten der 24 bis 48 Stunden bebrüteten Abstrichmaterialien die Gram-negativen Bakterien zu isolieren, wurde die Gram-Färbung mit anschließender mikroskopischer Begutachtung verwendet.

Die Originalmethode der Gram-Färbung wurde von dem dänischen Arzt Hans Christian Gram im Jahr 1884 entwickelt und erlaubt eine Differenzierung Gram-positiver und Gram-negativer Mikroorganismen. Für die Anfärbbarkeit der Mikroorganismen ist der Aufbau der Zellwand verantwortlich. Der im Zytoplasma eingelagerte lila Farbstoffkomplex kann in Gram-negativen Erregern sehr leicht ausgewaschen werden, während die Zellwand Gram-positiver Mikroorganismen gefärbt bleibt. Um die farblosen, Gram-negativen Bakterien sichtbar zu machen, wird eine Gegenfärbung durchgeführt.

Vor der Färbung werden die Bakterienausstriche zunächst auf dem Objektträger hitzefixiert. Anschließend wird der Ausstrich mit Gentianaviolett-Lösung, durch Auftropfen der Farblösung überschichtet und 2-3 Minuten angefärbt. Nach kurzem Abspülen mit Wasser wird der Ausstrich für 3 Minuten in Jodlösung eingestellt. Anschließend wird der Ausstrich in 96%igem Ethanol 20-30 Sekunden entfärbt und gründlich unter fließendem Leitungswasser ausgewaschen. Als nächstes wird Karbolfuchsin-Lösung (1:10 mit Aqua dest. verdünnt) auf den Ausstrich aufgetropft und für 30 Sekunden stehengelassen. Dann wird die Farblösung abgegossen und mit fließendem Leitungswasser abgespült. Nachdem der Objektträger getrocknet ist, wird der Ausstrich unter dem Mikroskop (Zugabe von Immersionsöl, Betrachtung bei 100-facher Vergrößerung) beurteilt.

2.5 Differenzierung Enterobakteriäzen / Nonfermentern

Mit dem Oxidase-Test weist man Cytochrom P450 bei Spezies nach, die Sauerstoff als endgültigen Elektronenakzeptor im Energiestoffwechsel verwenden. Cytochrom ist ein Farbstoff, der in der Bakterienzelle in reduzierter Form vorliegt. In diesem Zustand ist er farblos. Besitzt ein Mikroorganismus das Enzym Cytochrom-Oxidase, so wird ein auf dem

Teststreifen befindlicher Indikator oxidiert und schlägt nach blau -violett um (oxidasepositiv = Hinweis auf das Vorliegen eines Nonfermenters). Dazu wurden die Teststreifen der Firma Boehringer Ingelheim verwendet. Es wurden nach den Angaben des Herstellers 2-3 Kolonien mit einer sterilen Impföse vom Nährboden auf den Teststreifen aufgetragen und anhand der Farbreaktion, die sich innerhalb einer Minute einstellen muss, eine Einteilung in Oxidase-positive und negative Isolate vorgenommen.

Im Anschluss an diese Vordifferenzierung erfolgte die biochemische Charakterisierung mit Hilfe von Schnelltestverfahren wobei die Oxidase-positiven, Gram-negativen Isolate mittels Api® 20NE für Nonfermenter, die Oxidase-negativen Isolate mit dem Api® 20 E(nterobakteriazeen) differenziert wurden.

2.6 Biochemische Differenzierung der Bakterien

Für die Identifizierung der Stämme wurden standardisierte, kommerzielle Testsysteme Api® 20E und Api® 20NE (Firma bioMerieux, Nürtingen) verwendet. Diese miniaturisierten Verfahren beruhen auf dem Nachweis der physiologischen Merkmale der Bakterien mit Hilfe von Indikatormedien.

2.6.1 Durchführung des Api® 20E

Api® 20E ist ein standardisiertes System und dient der Identifizierung von Enterobacteriaceae und anderen gramnegativen, nicht anspruchsvollen Stäbchen. Der Api® 20E Streifen besteht aus 20 Mikroröhrchen, die dehydrierte Medien zum Nachweis von Enzymaktivitäten und Zuckerfermentation bzw. Zuckeroxidation. Vor der Beimpfung wurden ca. 5 ml destilliertes Wasser in die Inkubationswanne gegeben, um eine feuchte Kammer herzustellen. Die Labornummer des Isolates wurde auf dem seitlichen Teil der Wanne notiert und der Streifen dort platziert. Nach der Bereitstellung eines sterilen Röhrchens mit 5 ml NaCl 0,9 % oder 5 ml sterilem Aqua destillata ohne Zusätze wurde eine Einzelkolonie der zuvor hergestellten Reinkultur im Suspensionsmedium homogenisiert. Bei diesem Verfahren wurden vorzugsweise Über-Nacht-Kulturen (nach 18-24 Stunden Bebrütungszeit) verwendet.

Anschließend wurde der Api[®] 20E Streifen mit der vorbereiteten Suspension, deren Trübung dem McFarland- Standard 0,5 entsprach, nach Angaben des Herstellers beimpft. Dabei wurden einige der Streifenbecher mit Paraffinöl überschichtet, um anaerobe Bedingungen herzustellen. Abschließend wurde die Inkubationswanne abgedeckt und für 18-24 Stunden bei 36°C ± 2°C inkubiert. Nach der vorgegebenen Zeit erfolgte die Ablesung der Teststreifen mit Hilfe der vom Hersteller mitgelieferten Tabelle. Zuerst wurden alle Spontanreaktionen auf dem Ergebnisblatt notiert und anschließend die Tests, die eine Reagenzzugabe erforderten, geprüft. Für die Interpretation der Testergebnisse benötigt man ein numerisches Profil, das anhand der einzelnen biochemischen Reaktionen auf dem Ergebnisblatt erstellt wurde. Die Identifizierung erfolgte anhand der Datenbasis mit der aktuellen Identifizierungssoftware APILAB Plus Version 33.3.

2.6.2 Durchführung des Api[®] 20NE:

Api[®] 20NE ist ein standardisiertes Testsystem zur Identifizierung nicht anspruchsvoller, Gram-negativer Stäbchen, die nicht zur Familie der *Enterobacteriaceae* gehören. Dieses Verfahren wird bei der Differenzierung von Bakterien der Gattungen *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Vibrio*, *Aeromonas* und anderer Nonfermenter eingesetzt. Der Api[®] 20NE Streifen enthält 20 Mikroröhrchen mit dehydrierten Substraten. In 8 Röhrchen kommt es nach Beimpfung mit der Keimsuspension zu konventionellen Reaktionen, d.h. die während der Inkubation entstandenen Stoffwechselprodukte bewirken direkt oder nach Zugabe von Reagenzien Farbumschläge. Die restlichen 12 Mikroröhrchen wurden mit einem Minimalmedium beimpft und zeigten Assimilationsreaktionen an. Dabei wuchsen die Bakterien nur dann, wenn sie das entsprechende Substrat verwerten konnten.

Nach der Vorbereitung des Teststreifens wurden 1-4 morphologisch gleiche Kolonien (18 – 24 Stunden alt) vom Agar abgenommen und im API NaCl 0,85% Medium (2 ml) gut homogenisiert. Diese Suspension entsprach dem Trübungsstandard McFarland 0,5. Die Keimsuspension wurde in die Röhrchen NO₃ bis PNPG pipettiert. Dabei wurden nur die Röhrchen, nicht die Becher gefüllt. Anschließend wurden ca. 200 µl der restlichen Keimsuspension in die Ampulle API AUX Medium überfüllt und gut homogenisiert. Im Folgenden wurden die Röhrchen und die Becher der Tests GLU bis PAC mit der Suspension beimpft und die Becher GLU, ADH und URE mit Paraffinöl überschichtet. Zuletzt wurde die Inkubationswanne abgedeckt und für 24 Stunden (± 2 Stunden) bei 29 °C (± 2 °) inkubiert.

Nach der vorgegebenen Zeit erfolgte die Ablesung der Teststreifen mit Hilfe der vom Hersteller mitgelieferten Tabelle. Zuerst wurden alle Spontanreaktionen auf dem Ergebnisblatt notiert und anschließend die Tests, die eine Reagenzzugabe erforderten, geprüft. Für die Interpretation der Testergebnisse benötigte man ein numerisches Profil, das anhand der einzelnen biochemischen Reaktionen auf dem Ergebnisblatt erstellt wurde. Die Identifizierung erfolgte anhand der Datenbasis mit der aktuellen Identifizierungssoftware APILAB Plus V. 33.3.

2.7 Phänotypische Resistenzbestimmung

2.7.1 Einleitung

Die Resistenzbestimmung stellt ein *in vitro* Testsystem dar, mit dem ein Bakterienisolat nach Einwirkung eines Antibiotikums dosisabhängig als Folge des antibakteriellen Effektes aus seine Vermehrungs- oder Überlebensfähigkeit als sensibel, intermediär sensibel oder resistent gegenüber dem Antibiotikum charakterisiert wird.. Maßgeblich dafür ist die niedrigste vermehrungshemmende (bakteriostatische) Konzentration (minimale Hemmkonzentration, MHK) bzw. die niedrigste bakterizide Konzentration (minimale bakterizide Konzentration, MBK) eines Antibiotikums. Die phänotypische Resistenzbestimmung der Bakterienisolate wurde mit Hilfe von Mikrotitrationsplatten der Firma Merlin durchgeführt. Diese Empfindlichkeitsprüfung beruht auf der Rehydrierung von Antibiotika durch Zugabe einer standardisierten Bakteriensuspension. Dieses Verfahren erfasst phänotypische Resistenzen gegenüber den folgenden Antibiotika bzw. Substanzkombinationen:

- Ampicillin (AMP)
- Amoxicillin/ Clavulansäure (AMOX/ CLAV)
- Cefepim (CEFP)
- Cefepim/ Clavulansäure (CEFP/CLAV)
- Ceftazidim (CEZI)
- Ceftazidim/ Clavulansäure (CEZI/ CLAV)
- Cefotaxim (CETA)

- Cefotaxim/ Clavulansäure (CETA/ CLAV)
- Aztreonam (AZT)
- Cefpodoxim-Proxetil (CEPO)
- Cefpodoxim/ Clavulansäure (CEPO/ CLAV)
- Piperacillin (PIP)
- Piperacillin/ Tazobactam (PIP/ TAZ)
- Meropenem (MER)
- Cefoxitin (CEXI).

2.7.2 Arbeitsschritte

Mehrere einzeln liegende Kolonien einer 18-24 Stunden alten Reinkultur vom Blutagar (ohne Zusatz) wurden mit einer Impföse abgenommen und in 5 ml NaCl 0,9 % gut homogenisiert, bis die Suspension bei der photometrischen Messung dem Trübungsstandard McFarlane 0,5 (ca. 10^7 bis 10^8 KBE/ml) entsprach. Zur Reinheitskontrolle wurde die Bakteriensuspension auf eine Blutagarplatte überimpft. Danach wurden 50 µl der Bakteriensuspension in 11 ml Müller-Hinton II Bouillon pipettiert und gut homogenisiert. Es wurde Müller-Hinton Bouillon ohne Blutzusatz und mit angepasster Kationenkonzentration verwendet. Nach der Beschriftung der Testplatte erfolgte die Beimpfung der MICRONAUT-Platte nach Angaben des Herstellers mit 100 µl in jede Vertiefung des Tests. Anschließend wurde die Testplatte mit einer unperforierten Abklebefolie verschlossen und im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

2.7.3 Auswertung

Nach 18-24 Stunden wurde die Testplatte visuell ausgewertet und die Ergebnisse auf einem Plattenbelegungsplan protokolliert. Dabei galten die Kriterien trüb/ nicht trüb bzw. Wachstum/ kein Wachstum für jede Vertiefung der Platte. Die Ablesung erfolgte durch den direkten Vergleich mit der Wachstumskontrolle (ohne Antibiotikumzusatz) in der ersten Vertiefung der Mikrotitrationsplatte (s.Abb.4), die stets bewachsen (trüb) sein musste.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	GC	AMP	AMP	AMP	AMP	AMP	AMP	AMP	AMP	AMP	AMP	AMP
	0	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048
B	AMOX/ CLAV	AMOX/ CLAV	AMOX/ CLAV	AMOX/ CLAV	AMOX/ CLAV	AMOX/ CLAV	AMOX/ CLAV	AMOX/ CLAV	CEFP	CEFP	CEFP	CEFP
	1/2	2/2	4/2	8/2	16/2	32/2	64/2	128/2	2	4	8	16
C	CEZI	CEZI	CEZI	CEZI	CEZI	CEZI	CEZI	CEZI	CEFP/ CLAV	CEFP/ CLAV	CEFP/ CLAV	CEFP/ CLAV
	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	0,5/4	1/4	2/4	4/4
D	CEZI/ CLAV	CEZI/ CLAV	CEZI/ CLAV	CEZI/ CLAV	CEZI/ CLAV	CEZI/ CLAV	CEZI/ CLAV	CETA/ CLAV	CETA/ CLAV	CETA/ CLAV	CETA/ CLAV	CETA/ CLAV
	0,25/4	0,5/4	1/4	2/4	4/4	8/4	16/4	0,5/4	1/4	2/4	4/4	8/4
E	AZT	AZT	AZT	AZT	AZT	AZT	CETA	CETA	CETA	CETA	CETA	CETA
	1	2	4	8	16	32	0,5	1	2	4	8	16
F	CEPO	CEPO	CEPO	CEPO	CEPO	CEPO	CEPO	PIP	PIP	PIP	PIP	PIP
	0,25	0,5	1	2	4	8	16	4	8	16	32	64
G	CEPO/ CLAV	CEPO/ CLAV	CEPO/ CLAV	CEPO/ CLAV	CEPO/ CLAV	CEPO/ CLAV	CEPO/ CLAV	PIP/ TAZ	PIP/ TAZ	PIP/ TAZ	PIP/ TAZ	PIP/ TAZ
	0,25/4	0,5/4	1/4	2/4	4/4	8/4	16/4	4/4	8/4	16/4	32/4	64/4
H	MER	MER	MER	MER	MER	MER	MER	MER	CEXI	CEXI	CEXI	CEXI
	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	4	8	16	32

Abb.4: Schematische Darstellung einer MICRONAUT-Platte; Abkürzungen im Text erläutert

Abschließend wurden die ermittelten Ergebnisse in der Datenbank dokumentiert und die Einteilung in „empfindlich“ (S), „intermediär“ (I) und „resistent“ (R) anhand der Tabellen aus der PEG-Resistenzstudie 2001 (<http://www.p-e-g.org>) vorgenommen:

Für die Bakterienspezies *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Acinetobacter baumannii*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella oxytoca*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* gelten folgende MHK-Breakpoints:

<i>Antibiotikum</i>	<i>Sensibel</i> <i>MHK [mg/l]</i> <i><=</i>	<i>intermediär</i> <i>MHK [mg/l]</i>	<i>resistent</i> <i>MHK [mg/l]</i> <i>>=</i>
Amikacin	4	32 < I > 4	32
Amoxicillin/Clavulansäure	2	16 < I > 2	16
Ampicillin	2	16 < I > 2	16
Cefazolin	4	16 < I > 4	16
Cefepim	4	32 < I > 4	32
Cefotaxim	2	16 < I > 2	16
Cefotaxim/ Clavulansäure	2	16 < I > 2	16
Cefoxitin	4	16 < I > 4	16
Ceftazidim	4	32 < I > 4	32
Ceftazidim/ Clavulansäure	4	32 < I > 4	32
Cefuroxim	4	16 < I > 4	16
Ciprofloxacin	1	4 < I > 1	4
Cotrimoxazol	16	128 < I > 16	128

Doxycyclin	1	8 < I > 1	8
Gentamicin	1	8 < I > 1	8
Imipenem	2	8 < I > 2	8
Levofloxacin	2	8 < I > 2	8
Meropenem	2	16 < I > 2	16
Moxifloxacin	1	4 < I > 1	4
Nalidixinsäure	16	32 < I > 16	32
Piperacillin	4	64 < I > 4	64
Piperacillin/Tazobactam	4	64 < I > 4	64
Tobramycin	1	8 < I > 1	8
Trimethoprim	2	8 < I > 2	8

Tab.2: MHK-Breakpoints für *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Acinetobacter baumannii*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella oxytoca*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* (aus der PEG-Resistenzstudie; Paul Ehrlich Gesellschaft, 2001)

Für die Bakterienspezies *Stenotrophomonas maltophilia* gelten folgende MHK-Breakpoints:

<i>Antibiotikum</i>	<i>Sensibel</i>	<i>intermediär</i>	<i>resistent</i>
	<i>MHK [mg/l]</i>	<i>MHK [mg/l]</i>	<i>MHK [mg/l]</i>
	<i><=</i>		<i>>=</i>
Amikacin	4	32 < I > 4	32
Amoxicillin/Clavulansäure	2	16 < I > 2	16
Ampicillin	2	16 < I > 2	16

Cefazolin	4	16 < I > 4	16
Cefepim	4	32 < I > 4	32
Cefotaxim	2	16 < I > 2	16
Cefotaxim/ Clavulansäure	2	16 < I > 2	16
Cefoxitin	4	16 < I > 4	16
Ceftazidim	4	32 < I > 4	32
Ceftazidim/ Clavulansäure	4	32 < I > 4	32
Cefuroxim	4	16 < I > 4	16
Ciprofloxacin	1	4 < I > 1	4
Cotrimoxazol	16	128 < I > 16	128
Doxycyclin	1	8 < I > 1	8
Gentamicin	1	8 < I > 1	8
Imipenem	2	8 < I > 2	8
Levofloxacin	2	8 < I > 2	8
Meropenem	2	16 < I > 2	16
Moxifloxacin	1	4 < I > 1	4
Nalidixinsäure	16	32 < I > 16	32
Piperacillin	4	64 < I > 4	64
Piperacillin/Tazobactam	4	64 < I > 4	64
Tobramycin	1	8 < I > 1	8
Trimethoprim	2	8 < I > 2	8

Tab.3: MHK-Breakpoints für *Stenotrophomonas maltophilia* (PEG-Resistenzstudie 2001)

Für die Bakterienspezies *Pseudomonas aeruginosa* gelten folgende MHK-Breakpoints:

<i>Antibiotikum</i>	<i>Sensibel</i> <i>MHK [mg/l]</i> <=	<i>intermediär</i> <i>MHK [mg/l]</i>	<i>resistent</i> <i>MHK [mg/l]</i> >=
Amikacin	4	32 < I > 4	32
Cefepim	4	32 < I > 4	32
Ceftazidim	4	32 < I > 4	32
Ciprofloxacin	1	4 < I > 1	4
Gentamicin	1	8 < I > 1	8
Imipenem	2	8 < I > 2	8
Levofloxacin	2	8 < I > 2	8
Meropenem	2	16 < I > 2	16
Moxifloxacin	1	4 < I > 1	4
Piperacillin	4	64 < I > 4	64
Piperacillin/Tazobactam	4	64 < I > 4	64
Tobramycin	1	8 < I > 1	8

Tab.4: MHK-Breakpoints für *Pseudomonas aeruginosa* (PEG-Resistenzstudie 2001)

2.7.4 ESBL-Erkennung

Durch mehrere Abfragen in der Datenbank wurden so genannte Extended Spectrum Beta-Laktamase Bildner (ESBL) erfasst. ESBL sind sekundäre, plasmidkodierte Typ-A Betalaktamasen mit erweitertem Substratspektrum. Sie vermitteln klinisch relevante Resistenz

gegenüber Breitspektrum-Cephalosporinen (Cefalosporine der 3. und 4. Gruppe). Daraus resultierte eine in vivo Resistenz gegenüber folgenden Betalaktamantibiotika:

- Penicilline (Ampicillin, Amoxicillin, Ticarcillin, Carbenicillin, Piperacillin, Mezlocillin, Azlocillin)
- Cephalosporine der 1. Generation (Cefaclor, Cefadroxil, Cefalexin, Cefalothin, Cefazedon, Cefazolin)
- Cephalosporine der 2. Generation (Cefamandol, Cefotiam, Cefuroxim)
- Cephalosporine der 3. Generation (Cefetamet, Ceftibuten, Cefixim, Cefpodoxim, Cefoperazon, Cefotaxim, Ceftriaxon, Cefmenoxim, Ceftizoxim, Ceftazidim)
- Cephalosporine der 4. Generation (Cefepim, Cefpirom)
- Monobactame (Aztreonam)

Keine Resistenz besteht hingegen gegenüber den folgenden Betalaktamantibiotika:

- Carbapeneme (Imipenem, Meropenem, Ertapenem)
- Cephamycine (Cefoxitin).

Für die meisten ESBL gilt, dass sie durch Betalaktamase-Inhibitoren (Clavulansäure, Sulbactam, Tazobactam) gehemmt werden. Vereinzelt wurde jedoch vom Auftreten von ESBL berichtet, die keine Sensibilität gegenüber den Betalaktamase-Inhibitoren zeigen. Diese Inhibitor-resistenten ESBL (IRBL) weisen eine deutlich verminderte Hydrolyse-Aktivität gegenüber Cephalosporinen der 3. und 4. Generation (verringerte Cephalosporinase-Aktivität) auf. Der Resistenzphänotyp der ESBL variiert je nach ESBL-Typ und Menge der gebildeten Betalaktamasen. Bei *Enterobacter spp.*, *Citrobacter freundii*, *Serratia spp.*, *Morganella morganii*, *Providentia rettgeri* und *Klebsiella oxytoca* ist die Hyperproduktion der chromosomalen Betalaktamase der dominierende Faktor für die Resistenz gegenüber Betalaktamantibiotika. Eine konstitutive Hyperproduktion der chromosomalen Betalaktamase kommt bei diesen Stämmen sehr häufig vor und erzeugt ein Resistenzmuster, das den Resistenzphänotyp von ESBL vollständig überdeckt. Ein Nachweis von ESBL kann daher bei diesen Isolaten nur auf genetischer Ebene erfolgen. Bei *Escherichia coli*, *Shigella spp.*, *Salmonella spp.*, *Citrobacter diversus*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis* und *Klebsiella pneumoniae* sind ESBLs ein klinisch relevanter Faktor. Da eine Überproduktion der

chromosomalen Betalaktamase bei diesen Spezies bedeutend seltener ist, wird der ESBL-Resistenzphänotyp nicht überdeckt und kann somit anhand des erhaltenen Resistenzmusters erkannt werden.

Der Nachweis von ESBL erfolgte zunächst durch ein Screeningverfahren. Dabei konnte bei *Escherichia coli*, *Shigella spp.*, *Citrobacter diversus*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis* und *Klebsiella pneumoniae* ein ESBL-Verdacht geäußert werden, wenn folgendes Resistenzmuster gegeben war:

Antibiotikum	MHK Ergebnis
Cefpodoxim	> 4µg/ml und/oder
Ceftazidim	> 1µg/ml und/oder
Cefotaxim	> 1µg/ml und/oder

Tab.5: ESBL Resistenzmuster für *Escherichia coli*, *Shigella spp.*, *Citrobacter diversus*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis* und *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella oxytoca Isolate waren bei folgendem Resistenzmuster ESBL-verdächtig:

Antibiotikum	MHK Ergebnis
Ceftazidim	> 1µg/ml

Tab.6: ESBL Resistenzmuster für *Klebsiella oxytoca*

Anschließend wurde der phänotypische Bestätigungstest für die ESBL-verdächtigen Isolate durchgeführt. Dabei konnte von dem vorliegendem Resistenzphänotyp auf die Präsenz von ESBL geschlossen werden, wenn eine der Substanzkombinationen eine Reduktion des MHK-Wertes um 3 Verdünnungsstufen bezogen auf die Einzelsubstanz zeigte.

Bei *Escherichia coli*, *Shigella spp.*, *Citrobacter diversus*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis* und *Klebsiella pneumoniae* konnte ein ESBL bei folgendem Ergebnis phänotypisch bestätigt werden:

Antibiotikum	MHK Ergebnis
Cefpodoxim	MHK x µg/ml
Cefpodoxim/Clavulansäure	MHK x < 3 Titerstufen und/oder
Ceftazidim	MHK x µg/ml
Ceftazidim/Clavulansäure	MHK x < 3 Titerstufen und/oder
Cefotaxim	MHK x µg/ml
Cefotaxim/Clavulansäure	MHK x < 3 Titerstufen und/oder
Cefepim	MHK x µg/ml
Cefepim/Clavulansäure	MHK x < 3 Titerstufen

Tab. 7: phänotypischer ESBL-Bestätigungstest für *Escherichia coli*, *Shigella spp.*, *Citrobacter diversus*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis* und *Klebsiella pneumoniae*

Bei *Klebsiella oxytoca* deutete folgendes Resistenzmuster auf die ESBL-Präsenz hin:

Antibiotikum	MHK Ergebnis
Ceftazidim	MHK x µg/ml
Ceftazidim/Clavulansäure	MHK x < 3 Titerstufen

Tab. 8: phänotypischer ESBL-Bestätigungstest für *Klebsiella oxytoca*

Es konnte von einem ESBL bei *Klebsiella oxytoca* ausgegangen werden, wenn der Unterschied zwischen dem Ergebnis gegenüber der Einzelsubstanz Cefprozid und der Inhibitorkombination Cefprozid/ Clavulansäure mindestens 3 Verdünnungsstufen ausmachte ($X < 3$ Titerstufen).

Bei Aztreonam, Cefepim, Cefepodoxim orientierte man sich an den NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards)-Grenzwerten (Stand, 2002):

<i>Antibiotikum</i>	<i>Sensibel</i> <i>MHK (mg/l)</i> <i><=</i>	<i>intermediär</i> <i>MHK (mg/l)</i>	<i>resistent</i> <i>MHK (mg/l)</i> <i>>=</i>
Aztreonam	8	16	32
Cefepodoxim	2	4	8
Cefepim	8	16	32

Tab.9: NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards)-Grenzwerte für Aztreonam, Cefepim, Cefepodoxim

2.8 Rapid amplified polymorphic DNA (RAPD)

2.8.1 Allgemeine Verfahrensbeschreibung

Bei der RAPD handelt es sich um eine Methode, die unspezifische DNA-Fragmente einer unbekannten DNA amplifiziert. Dabei werden die vervielfältigten DNA-Fragmente zur Unterscheidung bzw. Vergleichbarkeit von einzelnen Stämmen einer Bakterienspezies genutzt. Im Prinzip ähnelt das Verfahren der Polymerasekettenreaktion, nur dass hierbei ein unspezifischer Primer verwendet wird.

2.8.2 Vorbereitung

Die Isolate wurden aus einer Mikrobank- Gefrierkultur auf Blutagarplatten ausgestrichen und über Nacht in einem Brutschrank bei 37 °C angezüchtet. Zur DNA- Extraktion wurden mehrere Kolonien dieser Reinkultur in 200 µl sterilem Wasser resuspendiert und 5 Minuten lang gekocht. Anschließend wurde die Suspension 2 Minuten bei 14.000 UpM zentrifugiert und 100 µl Überstand in ein steriles Eppendorfgefäß pipettiert. Die einzelnen Gefäße wurden nummeriert und mit der entsprechenden Mikrobank-Nummer (MB-Nr.) versehen. Bei jeder DNA-Vorbereitung wurde ein Eppendorfgefäß mit der Negativkontrolle (steriles Wasser+Reaktionsansatz ohne DNA) hergestellt, um eine evtl. Kontamination während der einzelnen Arbeitsschritte zu erkennen und falsch positive Ergebnisse auszuschließen. Als nächstes wurde der Prämix hergestellt.

2.8.3 Reaktionsansatz

	Mengenverhältnis
H ₂ O	15,75µl
10x Puffer	2,5µl
DNTP	2,5µl
Primer	4,0µl
Taq Polymerase	0,25 µl
DNA	2,0 µl

Bei der Durchführung wurden verschiedene Primer benutzt. Zum einen wurde der Primer **ERIC2** (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3') ⁷⁴ sowie der Primer **ST275** (5'-CCGGGCAAGC-3') ³⁹ verwendet.

2.8.4 Durchführung der RAPD

Die Belegung der RAPD-Platten erfolgte mit 23 µl Prämix in jede Vertiefung der Platte unter Zugabe von 2 µl der zuvor extrahierten DNA. Die Position des PCR-Ansatzes für jede Probe und die entsprechende MB-Nr. wurden auf einem Belegzettel dokumentiert. Die belegte RAPD- Platte wurde fest verschlossen und in einem Thermocycler platziert, wo ein vorprogrammierter PCR-Verlauf stattfand.

2.8.5 Temperaturen und Zyklen

Zyklus 1 bis 4:

94°C	5 Minuten
36°C	5 Minuten
72°C	5 Minuten

Zyklus 5 bis 35:

94°C	1 Minute
36°C	1 Minute
72°C	2 Minute

Abschließend wurde die Temperatur einmalig für 10 Minuten auf 72°C erhöht. Bis zur Darstellung des Amplifikationsergebnisses hielt das Programm die Proben bei 4 ° Celsius.

2.8.6 Gelelektrophorese

Im Anschluss erfolgt die Auswertung mittels der Gelelektrophorese (siehe 2.9.2)

2.9 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

2.9.1 Allgemeine Verfahrensbeschreibung

2.9.1.1 Einleitung

Die Polymerase-Kettenreaktion (engl. Polymerase Chain Reaction; PCR) ist eine 1984 vom kalifornischen Biochemiker Kary Mullis entwickelte Methode zur *in vitro*- Amplifizierung von Nukleinsäure- Fragmenten. Dieses Verfahren setzt eine Mischung aus einem Enzym und DNA Bausteinen ein, um eine Nukleinsäure oder DNA- Fragmente spezifisch zu vervielfältigen. Das Prinzip dieser inzwischen als Standardverfahren etablierten Methode der Vervielfältigung eines bestimmten Gens oder Sequenzabschnittes *in vitro* beruht auf der zyklischen DNA- Neusynthese der Zielsequenzen mit Hilfe des Enzyms DNA-Polymerase. Hierbei kommen in der Regel zwei synthetisch hergestellte Oligonukleotide zur Anwendung.

Sie dienen als sequenzspezifische Startermoleküle (engl. Primer) und werden so ausgewählt, dass sie antiparallel zueinander an beide DNS-Stränge hybridisieren, so dass nur der gewünschte DNA-Abschnitt amplifiziert wird.

Zunächst wird der DNA- Doppelstrang durch Erhöhung der Temperatur auf etwa 94 °C in Einzelstränge aufgespaltet und damit für die Anbindung der beiden Primer zugänglich gemacht. Diese lagern sich bei einer Temperatur von 50 °C, der so genannten Annealingtemperatur an, die komplementären Zielsequenzen auf den beiden Einzelstränge an. Durch die DNA-Polymerase werden die beiden Einzelstränge aus der zugesetzten Mischung von Basen nun zum jeweiligen Doppelstrang komplementiert. Anschließend wiederholt sich dieser Reaktionszyklus, welcher aus

- Denaturierung
- Anheften der Primer (Annealing) sowie
- Extension zu neuen Doppelsträngen besteht.

Werden diese Zyklen mehrfach wiederholt, so ergibt sich eine exponentielle Zunahme der amplifizierten DNA- Moleküle. Ursprünglich war diese Methode sehr zeitaufwendig, weil nach jeder Denaturierung die damals verwendete bakterielle DNA-Polymerase inaktiviert wurde und erneut zugesetzt werden musste. Nach den Vorarbeiten von Mullis werden nun DNA-Polymerasen verwendet, die aus thermophilen Bakterien stammen und daher nicht mehr durch die hohe Temperatur am Zyklusbeginn denaturiert werden. In dieser Untersuchung wurde Taq-Polymerase verwendet, die aus *Thermophilus aquaticus* isoliert wurde und bei der Firma Qiagen kommerziell erhältlich ist. Die einzelnen Temperaturschritte wurden maschinell mittels Thermocycler umgesetzt.

2.9.1.2 Vorbereitung

Die Isolate wurden aus einer Mikrobank- Gefrierkultur auf Blutagarplatten ausgestrichen und über Nacht in einem Brutschrank bei 37 °C angezüchtet. Zur DNA- Extraktion wurden mehrere Kolonien dieser Reinkultur in 200 µl sterilem Wasser resuspendiert und 5 Minuten lang gekocht. Anschließend wurde die Suspension zentrifugiert und der Überstand in ein steriles Eppendorfgefäß pipettiert. Die einzelnen Gefäße wurden nummeriert und mit der entsprechenden Mikrobank-Nummer (MB-Nr.) versehen. Bei jeder DNA-Vorbereitung wurde ein Eppendorfgefäß mit der Negativkontrolle (Mastermix mit sterilem Wasser anstelle von DNA) hergestellt, um eine evtl. Kontamination während der einzelnen Arbeitsschritte zu

erkennen und falsch positive Ergebnisse auszuschließen. Als nächstes wurde der Prämix hergestellt.

2.9.1.3 Reaktionsansatz

Zusammensetzung (25 µl Einfachansatz) :

	Mengenverhältnis	Prämix für 2x50 PCR
H ₂ O	10,7µl	535µl
10x Puffer	2,5µl	125µl
DNTP	1,0µl	50µl
Primer 1	1,0µl	50µl
Primer 2	1,0µl	50µl
Taq Polymerase	0,3 µl	15µl
Q50	5µl	250µl
MgCl ₂ (25 mM)	2,5µl	125µl

2.9.1.4 Durchführung der PCR

Die Belegung der PCR-Platten erfolgte mit 24 µl Prämix in jede Vertiefung der Platte unter Zugabe von 1 µl der zuvor extrahierten DNA. Die Position des PCR-Ansatzes für jede Probe und die entsprechende MB-Nr. wurden auf einem Belegzettel dokumentiert. Die belegte PCR-Platte enthielt 96 Vertiefungen mit jeweils 25 µl PCR-Ansatz. Sie wurde fest verschlossen und in einem Thermocycler platziert, wo ein vorprogrammierter PCR-Verlauf stattfand.

2.9.1.5 Temperaturen und Zyklen

Zyklus 1:

95°C	8 Minuten
------	-----------

Zyklus 2 bis 35:

94°C	1 Minute
55°C	1 Minute
72°C	2 Minuten

Abschließend wurde die Temperatur einmalig für 10 Minuten auf 72°C erhöht. Bis zur Darstellung des Amplifikationsergebnisses hielt das Programm die Temperatur der Proben bei 4 ° Celsius.

2.9.2 Gelelektrophorese

2.9.2.1 Einleitung

In einem Agarosegel werden die DNA-Fragmente durch Anlegen einer Spannung nach Größe und Ladung getrennt. Das Amplifikat im Gel wird mit Ethidiumbromid gefärbt. Indem es in die DNA-Moleküle interkaliert, kann die DNA damit unter UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert werden.

2.9.2.2 Gelherstellung

Zur Herstellung eines 2 % igen Agarosegels wurden 2 g des Agarosepulvers (Cambrex - SeaKem® LE Agarose) im Schott©-Flaschen abgewogen, mit 100 ml Laufpuffer (TAE (1×)) gelöst und kurz aufgeköcht. Anschließend wurde das Gel in eine Gießform dekantiert. Nach 30 min war das Gel fest und konnte in die mit 1 × TAE-Puffer gefüllte Kammer der Elektrophoresekammer gegeben werden.

2.9.2.3 Probenvorbereitung

In die Reaktionsgefäße wurden 10 µl des PCR-Reaktionsgemisches mit 2 µl Bluemarker pipettiert und durch kurzzeitiges Zentrifugieren vermischt. Der Bluemarker diente dazu, die zurückgelegte Laufstrecke der Amplifikate während der Elektrophorese sichtbar zu machen.

2.9.2.4 Durchführung

Die Proben wurden in die Slots des Gels gefüllt, wobei die äußeren Slots dem mit dem Marker (9 µl) belegt wurden. Bei einer Spannung von 80 V erfolgte die elektrophoretische Auftrennung unter Beobachtung des Bluemarkers, bis das Amplifikat das untere Drittel des Gels erreicht hatte. Das Gel wurde nach Entnahme aus der TAE-Pufferlösung für ca. 30 min

in die Ethidiumbromidlösung gegeben. Nach der abgeschlossenen Färbung der Banden wurde das Gel unter UV-Licht mit Biometra TI 1 Polaroid fotografiert. Anschließend wurden die Gelfotos mit Hilfe eines Scanners digitalisiert und im Arbeitsprotokoll dargestellt, wobei alle Slots des Gels mit den entsprechenden Mikrobanknummern versehen wurden.

2.10 Sequenzierung

2.9.1 Gelextraktion und Aufreinigung

Für die Extraktion der DNA aus den Agarosegelen wurde das QiAquick Gel Extraction Kit (Firma Qiagen, Hilden) verwendet. Zuerst wurden die Banden der mehrfach im Gel aufgetragenen Amplifikate (s.Abb.5) mit Hilfe eines Skalpell's ausgeschnitten.

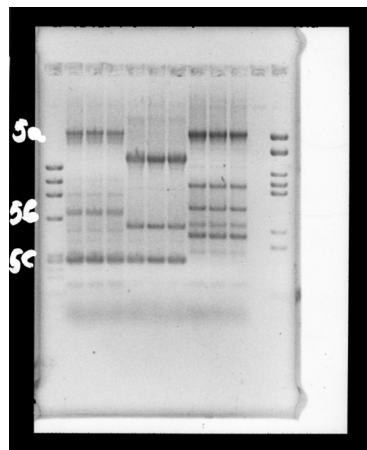


Abb.5: Gel mit mehrfach aufgetragenen Amplifikaten

Gelreste wurden von dem gewonnenen Fragment möglichst vollständig entfernt. Anschließend wurde der Gelausschnitt gewogen und in Puffer QG aufgelöst. Dazu verwendet man 3 Teile Buffer QG zu jeweils einem Teil Gelausschnitt (100mg ~ 100µl). Das Gemisch wurde anschließend in sterile Eppendorf Cups überführt und im Wasserbad bei 50°C für 20 Minuten inkubiert. Nachdem sich die Gelstücke komplett gelöst hatten, musste darauf geachtet werden, dass die Farbe der Lösung gelb war, da dies den optimalen pH-Bereich ($\text{pH} < 7,5$) für die QiAquick Membran anzeigt. Anschließend wurde 1 Volumenteil Isopropanol zugeben und gemischt. Zur Aufnahme der DNA aus der Lösung wurde eine QiAquick spin column (Membran) in einem 2ml Eppendorfgefäß platziert, das Gemisch einpipettiert (max.

800ml) und für 1 Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die QiAquick spin column wieder zurück in das Eppendorfgefäß platziert. Nach Fixieren der DNA an das Filter wurden 0,5ml von Puffer QG zugeführt und für 1 Minute zentrifugiert. Mit diesem Schritt werden alle Agarosereste entfernt. Im nachfolgenden Waschschrift wurden 0,75ml PE Puffer hinzugefügt und für 1 Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die QiAquick column letztmalig für eine Minute bei 13.000 rpm zentrifugiert. Das QiAquick column wird nun in ein frisches 1,5ml Eppendorfgefäß überführt. Um die DNA von der Membran zu lösen wurde 50µl des Elutionspuffers (10mM Tris-Cl, pH 8,5) genau in das Zentrum des Membran pipettiert und für eine Minute mit maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Die so gewonnene DNA wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei Kühlschranktemperatur (4 °C) aufbewahrt und stand für eine anschließende Sequenzierung bereit.

2.9.2 Sequenzierungstechnik

Zur Sequenzierung (s.Abb.6) wurde nach dem ABI PRISM® Protokoll (AmpliTaTM FS BigDyeTerminator) ein Reaktionsansatz aus 2,0µl Premix, DNA-Template (0,2-0,5µg dsDNA, 10-100ng PCR Produkt), sowie 5pmol Primer (Universal Primer -21M13: ACG ACG TTG TAA AAC GAC GGC CAG) erstellt und mit sterilem Wasser auf 20µl aufgefüllt. Im Anschluss wurden 25 Thermocycler-Zyklen gefahren (1 Zyklus entspricht: 10sec bei 96°C, 5sec bei 50°C sowie 4min bei 60°C (TC 2400/9600/9700 Emulation Mode)).

Bei diesem Schritt wird der Primer durch die Polymerase verlängert. An einer zufälligen Stelle wird somit ein Dideoxyadenosintriphosphat (ddATP) angehängt, welches mit einem für die jede Base spezifischen fluoreszierenden Farbmolekül kodiert ist. An dieser Stelle wird die Reaktion gestoppt und wieder von vorne begonnen.

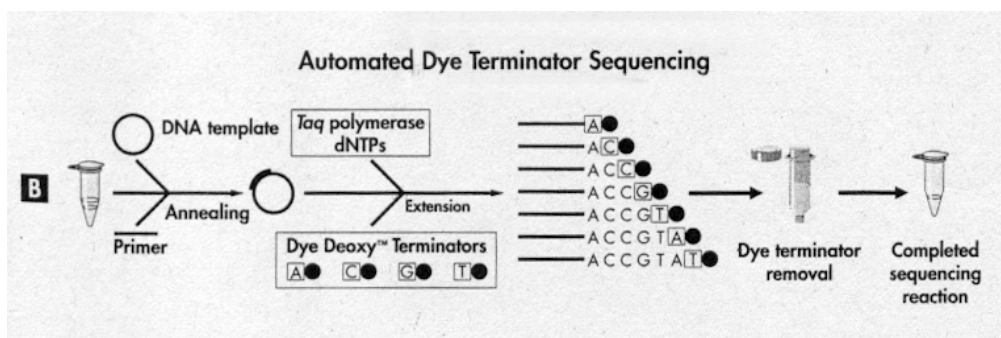


Abb.6: Schematische Darstellung des Sequenzierungsvorganges (Quelle: QiAquick Gel Extraction Kit Handbuch)

Im folgenden Schritt wird der Reaktionsansatz mit Hilfe der Ethanol-Fällung aufgereinigt. Dieser Schritt dient der Inhibierung des Sequenzierungsenzyms. Zuerst wurden 90µl H₂O, 10µl 3 M Natrium-Acetat pH 4,6 (1Vol DNA Lösung + 1/10 Vol 3 NaAc + 2,5 Vol 100% EtOH) und 250 µl 100% EtBr (bei Raumtemperatur, RT) zugegeben. Das Gemisch wurde nun bei RT für 30min mit 13.000 rpm zentrifugiert. Das Ethidiumbromid (EtBr) wurde anschließend entfernt und das Gemisch mit 250µl 70% EtBr gewaschen. Nun wurde mit 13.000 rpm 5min lang zentrifugiert. Das EtBr wurde im Anschluss wieder entfernt und das Pellet für 5min im Speed-Vac getrocknet. Zur Probenvorlage wurden 4µl des getrockneten Ansatzes mit 16µl HPLC-Wasser versetzt.

Die Proben wurden im folgenden Schritt mit Hilfe des ABI 3100 ausgewertet. Dazu wurde eine 96- Well-Platte mit den Proben bestückt. Die einzelnen Proben wurden mit Hilfe der hauseigenen Software des Biologisch-Medizinischen Forschungszentrums (BMFZ) mit einer eindeutigen Kennzeichnung versehen und die Platte in dem Gerät platziert. Anschließend erfolgte die automatische Sequenzierung im Gerät. Die Primer-DNA-Stränge werden dabei mit Hilfe einer Elektrophorese aufgetrennt. Die entstehenden Banden sind bereits mit dem jeweiligen basenspezifischen fluoreszierenden Farbstoff markiert. Das Gel wird elektrisch angeregt und dabei mit Hilfe einer optischen Einheit abgetastet. Die CCD Kamera konvertiert so die analogen Fluoreszenz-Informationen in digitale Signale und übermittelt diese an den Computer. Dieser erstellt aus den Daten ein Electropherogramm (s.Abb.7) und die entsprechende Gensequenz.

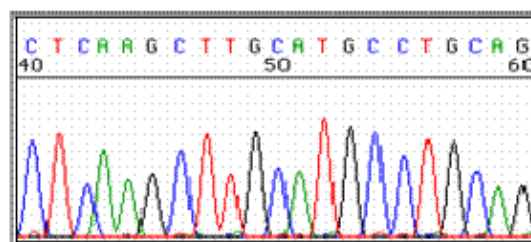


Abb.7: Beispiel für ein Electropherogramm

Das Ergebnis wird als Textdatei gespeichert und kann mit einer Gendatenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) auf Übereinstimmungen mit bereits bekannten Sequenzen überprüft werden. Dazu wird die Sequenz im sogenannten FASTA-Format in das vorhandene Eingabefenster kopiert. Es kommt zum automatischen Vergleich mit den wichtigsten Nukleotiddatenbanken, wie EMBL und anderen. Das Ergebnis erscheint als

Dendrogramm (s.Abb.8) mit einer prozentualen Angabe der Sequenzhomologien mit den in der Datenbank vorhandenen Sequenzen.

```
TTGNNTGTGNCAATTATGTGCTTAGTGATCTAACGCTTGAGTTAAGCCGCGCCGCGAAGCGGCGTCGGCTTGAACGAA
TTGTTAGACATTATTTGCCGACTACCTTGGTGATCTCGCCTTTACGTAAGTGAACAAATCTTCCAAGTATCTGCGCGC
GAGGCCAAGCGATCTTCTTCTTGTCCAAGATAAGCCTGTCTAGCTTCAAGTATGACGGGCTGATACTGGGCGGCGAGGCG
CTCCATTGCCAGTCGGCAGCGACATCCTTCGGCGCGATTCTGCCGCTTACTGCGCTGTACCAAAATGCGGGACAACGTAA
GCACTACATTTTCGCTCATCGCCAGCCAGTCGGGCGGCGAGTTCCATAGCGTTAAGGTTTCATTTAGCGCCTCAAATAGA
TCCTGTTTCAAGAACCGGATCAAAGAGTTCTCCGCGCTGGACCTACCAAGGCAACGCTATGTTCTTCTGCTTTTGTGAG
CAAGATAGCCAGATCAATGTCGATCGTGGCTGGCTCGAAGATACTGCAAGAATGTCATTGCGCTGCCATTCTCAAATTT
GCAGTTTCGCGCTTAGCTGGATAACGCCACGGAATGATGTCGTCGTGCACAACAATGGTGACTTCTACAGCGCGGAGAATC
TCGCTCTCTNCAGGGGAAGCCGAAGTTTCCAAAAGGTCGTTGATCAAAGCTCGCCGNGTTGTTTCATCAAGCCTTACGGT
CACCCTAACCCAGCAAATCAATATCACTGTGTGGCTTCAGGCCGCTTCCCTGGGGANCCNTACAAATGTACGGNCAGNAN
NNNGNTNNNGANGNGCTCGATNANNCNACTACNTNTAAAGNTGANNNNANNCCTTNGNNATNACGNTTCTTNGATNT
TANNCCGGNAANNGNANGNAANCTGGNNGGTTTTGGNNNAANGGGNANGNTNGNAANCCNNNTNCCNTNNNANCNTTN
NCNANTGGNANNNNTNNNNNNNGNNANNTNGGNAANGNNNAANNNNGGNNNNN
```

Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida class I integron
aminoglycoside adenylyltransferase (aadA1) gene,
complete cds
Length = 1194

Score = 1499 bits (756), Expect = 0.0
Identities = 779/787 (98%), Gaps = 1/787 (0%)
Strand = Plus / Minus

```
Query: 12  caattatgtgcttagtgcatctaacgcttgagttaagccgcgcgcgaagcggtcggtcg 71
          |||
Sbjct: 898  caattatgtgcttagtgcatctaacgcttgagttaagccgcgcgcgaagcggtcggtcg 839

Query: 72  ttgaacgaattgtagacattatttgcgactaccttggtgatctcgctttcacgtagt 131
          |||
Sbjct: 838  ttgaacgaattgtagacattatttgcgactaccttggtgatctcgctttcacgtagt 779

Query: 132  gaacaaattcttccaactgatctgcgcgcgaggccaagcgatcttcttctgtccaagat 191
          |||
Sbjct: 778  gaacaaattcttccaactgatctgcgcgcgaggccaagcgatcttcttctgtccaagat 719

Query: 192  aagcctgtctagcttcaagtatgacgggctgatactgggcccgcgaggcgctccattgccc 251
          |||
Sbjct: 718  aagcctgtctagcttcaagtatgacgggctgatactgggcccgcgaggcgctccattgccc 659

Query: 252  agtcggcagcgacatccttcggcgcgattctgcccgttactgctgtaccaaagcgagg 311
          |||
Sbjct: 658  agtcggcagcgacatccttcggcgcgattctgcccgttactgctgtaccaaagcgagg 599

Query: 312  acaacgtaagcactacatttcgctcatcgccagcccagtcgggcccgcgagttccatagcg 371
          |||
Sbjct: 598  acaacgtaagcactacatttcgctcatcgccagcccagtcgggcccgcgagttccatagcg 539

Query: 372  ttaaggtttcatttagcgcctcaaatagatcctgttcaggaaccggatcaaagagttcct 431
          |||
Sbjct: 538  ttaaggtttcatttagcgcctcaaatagatcctgttcaggaaccggatcaaagagttcct 479
```

Query: 432 ccgccgctggacctaccaaggcaacgctatgttctcttgcttttgcagcaagatagcca 491
|||||
Sbjct: 478 ccgccgctggacctaccaaggcaacgctatgttctcttgcttttgcagcaagatagcca 419

Query: 492 gatcaatgtcgatcgctggctggctcgaagatacctgcaagaatgtcattgcgctgccatt 551
|||||
Sbjct: 418 gatcaatgtcgatcgctggctggctcgaagatacctgcaagaatgtcattgcgctgccatt 359

Query: 552 ctccaaattgcagttcgcgcttagctggataacgccacggaatgatgtcgtcgtgcacaa 611
|||||
Sbjct: 358 ctccaaattgcagttcgcgcttagctggataacgccacggaatgatgtcgtcgtgcacaa 299

Query: 612 caatggtgacttctacagcgcggagaatctcgtctctcncaggggaagccgaagtttcca 671
|||||
Sbjct: 298 caatggtgacttctacagcgcggagaatctcgtctctcncaggggaagccgaagtttcca 239

Query: 672 aaaggctggtgatcaaagctcgccgngttgtttcatcaagccttacggtcacgtaacca 731
|||||
Sbjct: 238 aaaggctggtgatcaaagctcgccgngttgtttcatcaagccttacggtcacgtaacca 179

Query: 732 gcaaatcaatatcactgtgtggcttcaggccgccttcc-ctgggganccntacaaatgta 790
|||||
Sbjct: 178 gcaaatcaatatcactgtgtggcttcaggccgcatccactgaggagccgtacaaatgta 119

Query: 791 cggncag 797
|||
Sbjct: 118 cggccag 112

Abb.8: Dendogramm einer Sequenzanalyse

3. Ergebnisse

3.1 Allgemeiner Teil

In dieser Studie wurden über einen Zeitraum von 45 Tagen (01.04.2003-15.05.2003) insgesamt 59 Patienten beobachtet, alle relevanten infektiologischen Parameter erhoben und alle verfügbaren mikrobiologischen Materialien untersucht. Der Alterdurchschnitt des Patientenkollektivs lag bei 64 Jahren. Der jüngste Patient war 18 Jahre, der Älteste 84 alt. Die Standardabweichung betrug 14,58 Jahre (s.Abb.8).

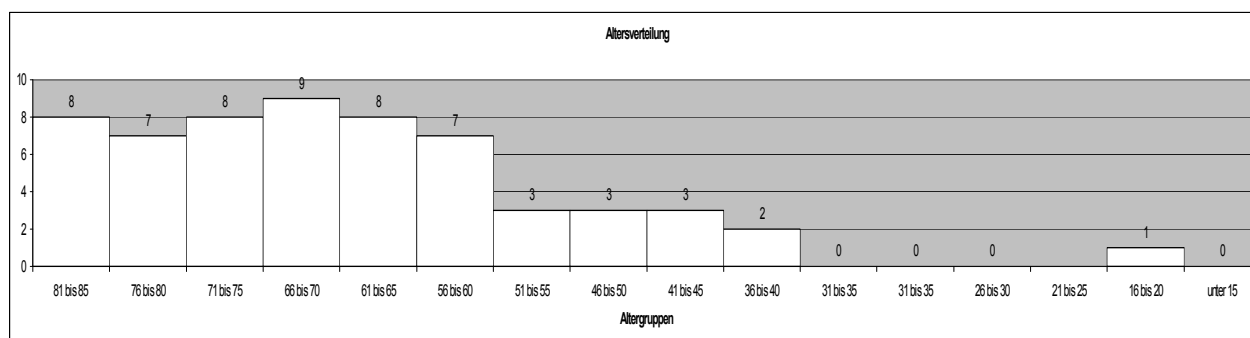


Abb.8: Altersverteilung des beobachteten Patientenkollektivs

Der Anteil der männlichen Patienten entsprach 62,7% (37 Patienten), der der weiblichen 37,3% (22 Patienten). Die Beobachtungsdauer des einzelnen Patienten lag durchschnittlich bei 8,8 Tagen, wobei das Maximum 45 Tage und das Minimum 1 Tag betrug (s.Abb.9).

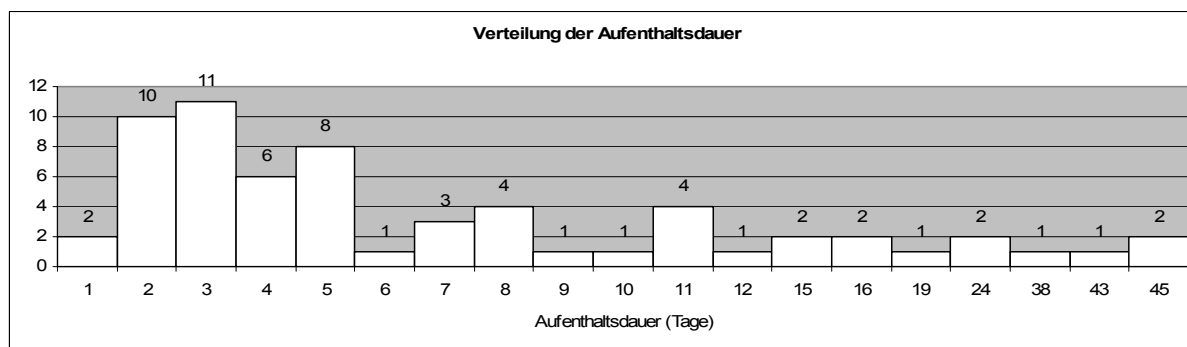


Abb.9: Aufenthaltsdauer

Die beobachteten Patienten hatten vor Beginn der Studie im Durchschnitt bereits 5,97 Tage auf einer Intensivstation verbracht, mit einem Maximum von 169 Tagen. Die Liegedauer auf einer peripheren Station vor Einschluss in die Studie lag durchschnittlich bei 7,42 Tagen, wobei ein Maximum von 41 Tagen erreicht wurde.

3.2 Klinische Aspekte des Patientenkollektivs

Bei dem Patientenkollektiv handelte es sich überwiegend um chirurgische Patienten. Nach der Einweisungsdiagnose gruppiert hatten 69,49% der Patienten eine kardiovaskuläre Einweisungsdiagnose, 8,47% eine respiratorische, 20,34% eine onkologische, 8,47% eine gastroenterologische, 3,39% eine endokrinologische, 8,47% eine unfallchirurgische und 15,25% eine nicht in die genannten Kategorien einzuordnende Einweisungsdiagnose. Die Anzahl und Verteilung innerhalb der gebildeten Kategorien sind in Tabelle 10 dargestellt.

KARDIOVASKULÄR		
"Coral reef aorta"	1	1,69%
Aortenaneurysma	6	10,17%
Arteria Carotis Interna - Stenose	2	3,39%
akutes Koronarsyndrom	1	1,69%
Angina abdominalis	1	1,69%
Aortenklappenstenose	3	5,08%
Arterielle Verschlusskrankheit	1	1,69%
Bradykardie	2	3,39%
Z.n. Reanimation	2	3,39%
ischämisch bedingte dilatative Kardiomyopathie	1	1,69%
Koronare Herzkrankheit	17	28,81%
Mitralvitium - Endokarditis	1	1,69%
Mitralinsuffizienz	2	3,39%
Thrombendarteriektomie	1	1,69%
Summe	41	69,49%

RESPIRATORISCH		
Respiratorische Insuffizienz	5	8,47%
Summe	5	8,47%

ONKOLOGISCH		
Anastomoseninsuffizienz nach Magen-OP	1	1,69%
Eingangsstenose Pharynxebene	1	1,69%
Lebermetastasen	1	1,69%
Pankreaskopf-Carcinom	2	3,39%
Plattenepithelkarzinom Mundboden	3	5,08%
Plattenepithelkarzinom Zunge	1	1,69%
Polyposis coli	1	1,69%
Rektum-Carcinom	1	1,69%
Speicheldrüsenausgangs-Carcinom (vorderer Mundboden)	1	1,69%
Summe	12	20,34%

GASTROENTEROLOGISCH		
Akute Cholezystolithiasis	1	1,69%
akute gastrointestinale Blutung (Ulcus duodeni)	1	1,69%
akutes Abdomen	2	3,39%
Ileus	1	1,69%
Summe	5	8,47%

ENDOKRINO-/NEPHROLOGISCH		
dekompensierte Niereninsuffizienz	1	1,69%
Hyperglykämie	1	1,69%
Summe	2	3,39%

UNFALLCHIRURGISCH		
Wirbelkörperbruch	2	3,39%
Multiple Frakturen	1	1,69%
Polytrauma	2	3,39%
Summe	5	8,47%

SONSTIGE		
Nahtinsuffizienz (nicht näher bezeichnet)	1	1,69%
Oesophagusruptur	1	1,69%
Mediastinitis	1	1,69%
Milzruptur	1	1,69%
Dysgnathie	2	3,39%
Platzbauch, Dünndarmperforation	1	1,69%
Subarachnoidalblutung	1	1,69%
Sepsis	1	1,69%
Summe	9	15,25%

Tab.10: Häufigkeit und Verteilung der Einweisungsdiagnosen

Bei 12 Patienten (20,34%) wurde während des Beobachtungszeitraumes eine Dialyse durchgeführt. Durchschnittlich wurde ein Patient 15,5 Tage dialysiert (s.Tab.11).

Dialyse:			
Anzahl	12	Patienten	20,34%
Dauer	<i>Durchschnitt</i>	15,5	<i>Tage</i>
	<i>Maximum</i>	44	<i>Tage</i>
	<i>Minimum</i>	2	<i>Tage</i>

Tab.11: Dialyse Übersicht

Bei der Dokumentation der Patientendaten wurden die folgenden infektiologischen Parameter beobachtet, um den Zusammenhang zwischen dem Infektionszeichen des Patienten und einer Keimbesiedlung/Infektion mit integronhaltigen Bakterien zu untersuchen:

- Das „C-reaktive-Protein“ (CRP) gehört zu den Akutphaseproteinen und steigt bei einer bakteriell bedingten Infektion an. Es besitzt keine Organ- oder Krankheitsspezifität, ist aber bei akuten oder chronischen Entzündungen in den meisten Fällen erhöht und daher für die Infektionsdiagnostik von großer Bedeutung. Eine CRP-Erhöhung ohne Infektion wird allerdings auch postoperativ, bei Tumoren und nach Herzinfarkten beobachtet. Kommt eine Erhöhung der Leukozytenzahl und der Körpertemperatur hinzu, ist eine bakterielle Infektion sehr wahrscheinlich ⁵³. Eine Schlussfolgerung über die Schwere der Infektion aufgrund der Höhe des CRP-Wertes ist nicht möglich. Der Normwert des CRP für Erwachsene liegt bei einer nephelometrischen Bestimmung bei <0,6mg/dl. Der Durchschnittswert des Patientenkollektivs lag bei 15,5 mg/dl mit einer Standardabweichung von 20,6 mg/dl (s.Tab.12).
- Die Höhe Leukozytenzahl korreliert mit der Schwere der Infektion. Da sich dieser Wert, dessen Normbereich bei 4,0-10,0/nl liegt, aus Granulozyten (überwiegend bakterienspezifisch) und Lymphozyten (überwiegend virenspezifisch) zusammensetzt, lässt sich aus einer Leukozytenerhöhung keine Aussage über den Erregertyp ableiten.

Eine Leukozytose ist ebenfalls bei Stresssituationen, Traumata, Verbrennungen, akuten Blutungen und Infarkten zu beobachten. Der Durchschnittswert lag in unserem Patientenkollektiv bei 12,5/nl, die Standardabweichung bei 5,9/nl (s.Tab.12).

<u>Laborwert</u>	<u>Durchschnitt</u>	<u>Maximum</u>	<u>Minimum</u>
CRP [mg/dl]	15,48	278	0
Leukozyten [1/mm ³]	12469,97	40900	3500

Tab.12: Statistik der Laborwerte in der Übersicht

Zur Erfassung des Krankheitsgrades wurden 3 verschiedene Scores erhoben, die jeweils unterschiedliche Aussagen über Prognose, bzw. Grad der Erkrankungen machen.

- Bei dem APACHE II Score handelt es sich um einen Score der eine Aussage über die Sterbewahrscheinlichkeit eines Patienten macht ³⁴ (s. Material und Methoden). Der Durchschnittswert lag hier bei 21,03 mit einer Standardabweichung von 7,16. Das Maximum lag bei 36 und das Minimum bei 4. Erwartungsgemäß konnte in der Studie gezeigt werden, dass der Durchschnittswert von später verstorbenen Patienten bei 27,28 lag und somit signifikant höher war, als bei dem Rest des Patientenkollektivs (17,30).
- Der aus dem Clinical Pulmonary Infection Score (CPIS) resultierende Wert korreliert mit der Schwere der Atemwegsinfektion ⁵⁴ (s. Material und Methoden). Hierbei können Werte von 0 bis 10 erreicht werden. Der Durchschnittswert in unserem Patientenkollektiv lag bei 2,90 mit einem Maximum von 7.
- Zur allgemeinen Quantifizierung des Krankheitsgrades in Bezug auf Infektionserkrankungen wurde der Sepsis-related Organ Failure (SOFA) Score erhoben ⁷⁶. Der bei einer fulminanten Sepsis maximal erreichbare Wert des Scores beträgt 24. In unserem Patientenkollektiv konnten Werte von 0 bis 20 bei einem Durchschnittswert von 8,8 erhoben werden.

<u>Score</u>	<u>Durchschnitt</u>	<u>Maximum</u>	<u>Minimum</u>
APACHE II	21,03	36	4
CPIS	2,99	7	0
SOFA	8,79	20	0

Tab.13: Statistik der Scores in der Übersicht

Da viele der auf einer Intensivstation erworbenen Infektionen ihren Ursprung von dauerhaft eingeführten Fremdmaterialien wie Harnwegskathetern, Zentralvenösen Kathetern (ZVKs), periphervenösen Zugängen und Endotrachealtuben nehmen, wurde hier eine genaue Dokumentation solcher „Devices“, ihrer Liegedauer und bei Gefäßkathetern der Lokalisation, vorgenommen.

Bei allen Patienten wurde ein Harnwegskatheter gelegt, die durchschnittliche Liegezeit betrug dabei 9,34 Tage (s.Tab.14).

HWK			
Anzahl insgesamt	68		
	bei 59 Patienten	=>	100%
Liegedauer			
Durchschnitt	9,34	Tage	
Maximum	38	Tage	
Minimum	2	Tage	

Tab.14: Anzahl und Liegezeit von Harnwegskathetern

58 Patienten (98,32%) hatten einen zentralvenösen Verweilkatheter mit einer durchschnittlichen Liegezeit von 6,14 Tagen (s.Tab.15).

ZVK				
<u>Lage</u>	<u>Anzahl</u>	<u>Liegedauer [Tage]</u>		
		<u>Durchschnitt</u>	<u>Maximum</u>	<u>Minimum</u>
Gesamt	96	6,14	38	2
V. subclavia	44	7,95	29	1
V. jugularis int.	44	8,34	19	1
V. femoralis	5	5,60	7	4
V. brachialis	3	3,00	5	2

Tab.15: zentralvenöse Gefäßkatheter: Verweildauer und Insertionsstelle

46 Patienten wurden endotracheal intubiert und der Tubus wurde dort für durchschnittlich 5,1 Tage belassen. 17 Patienten erhielten ein Tracheostoma was im Beobachtungszeitraum für durchschnittlich 10,39 Tage getragen wurde (s.Tab.16).

Device	Patientenanzahl	Liegedauer [Tage]		
		Durchschnitt	Maximum	Minimum
Endotrachealtubus	46	5,1	20	1
Tracheostoma	17	10,39	24	1

Tab.16:Anzahl der intubierten Patienten mit Endotrachealtuben / Tracheostomata

Ein periphervenöser Zugang wurde bei 41 Patienten gelegt (s.Tab.17).

Venöser peripherer Zugang				
Lage	Anzahl	Liegedauer [Tage]		
		Durchschnitt	Maximum	Minimum
gesamt	61	4,16	9	1
Handrücken	50	3,27	9	1
Ellenbeuge	5	5,00	6	3
Unterarm	4	4,75	9	3
V. jugularis ext.	2	5,50	6	5

Tab.17: Periphervenöse Zugänge mit Insertionsstelle und Dauer des Verbleibs

Ein arterieller Zugang zur blutigen Blutdruckmessung war bei 94,92% der Patienten vorhanden. Im Durchschnitt betrug die Liegedauer 8,19 Tage (s.Tab.18).

Arterieller Zugang				
Lage	Anzahl	Liegedauer [Tage]		
		Durchschnitt	Maximum	Minimum
gesamt	77	8,19	38	1
A. radialis	49	7,45	38	1
A. femoralis	13	13,23	36	3
A. brachialis	12	10,92	38	4
A. axillaris	3	32	34	30

Tab.18: arterielle Zugänge mit Insertionsstelle und Liegedauer

Bei 89,83% der Patienten wurde eine Magensonde gelegt, die im Schnitt für 9,49 Tage liegen blieb (s.Tab.19).

Magensonden			
Anzahl insgesamt	53 Patienten		89,83%
Liegedauer	<i>Durchschnitt</i>	9,49	<i>Tage</i>
	<i>Maximum</i>	44	<i>Tage</i>
	<i>Minimum</i>	1	<i>Tage</i>

Tab.19: Magensonden

Ein besonderes Augenmerk wurde auf die Erfassung der postoperativen Drainagenversorgung gelegt. Eine Drainage hatten 83% der Patienten, die durchschnittliche Liegedauer betrug 5,5 Tage (s.Tab.20).

Drainagen				
Lage	Anzahl	Liegedauer [Tage]		
		Durchschnitt	Maximum	Minimum
Gesamt	134	5,5	26	2
Thoraxdrainage	79	4,67	10	2
Easyflow Abdomen	16	8,63	26	2
Redon Abdomen	35	4,06	7	2
Vakuumdrainage Abdomen	4	7,00	14	3

Tab.20: Art und Anzahl der Drainagen mit Liegezeit

Für die gesamte Intensivstation wurden die Anwendungsraten der einzelnen Devices berechnet (s.Tab.21). Hierbei lag die Anwendungsrate der Magensonde mit 100% an erster Stelle. Obwohl bei allen Patienten der Station ein Harnwegskatheter angelegt wurde, verblieb dieser in einigen Fällen nicht für die Gesamtdauer des Aufenthaltes. Die Anwendungsrate für Harnwegskatheter lag daher nur bei 96,56% (siehe Tab.14). Die Anwendungsrate des Endotrachealtubus dagegen lag nur bei 45,94%.

Device	Anzahl Patiententage	Anzahl der Device-Tage	Device-Anwendungsrate [%] *
Magensonde	665	665	100,00
Zentralvenöser Katheter	677	675	99,70
Harnwegskatheter	697	673	96,56
Tracheostoma	572	310	54,20
Tubus	566	260	45,94

Tab.21: Übersicht über die Anwendungsrate der Devices nach Häufigkeit sortiert. *Device-Anwendungsrate = Anzahl Device-Tage / Anzahl der Patiententage x 100

Der Antibiotikaverbrauch in unserem Beobachtungszeitraum auf der Intensivstation wurde mit Hilfe der Umrechnung in defined daily doses (DDDs) vergleichbar gemacht (s. Material und Methoden) (s.Tab.22).

Antibiotikum	Antibiotika-Tage	Gesamtdosis (g)	DDD-Wert*	eingesetzte DDD**	DDD pro 1000 Patienten-Tage***
Ampicillin + Sulbactam	36	294,00	2,00	147,00	4083,33
Sulbactam	45	96,00	1,00	96,00	2133,33
Flucloxacillin	12	40,50	2,00	20,25	1687,50
Cefepim	24	75,00	2,00	37,50	1562,50
Ampicillin	24	68,00	2,00	34,00	1416,67
Ciprofloxacin	95	65,40	0,50	130,80	1376,84
Vancomycin	16	41,00	2,00	20,50	1281,25
Gentamicin	5	1,50	0,24	6,25	1250,00
Moxifloxacin	27	13,40	0,40	33,50	1240,74
Cefazolin	104	351,00	3,00	117,00	1125,00
Ceftriaxon	5	11,00	2,00	5,50	1100,00
Fluconazol	12	2,40	0,20	12,00	1000,00
Levofloxacin	11	5,50	0,50	11,00	1000,00
Linezolid	13	15,60	1,20	13,00	1000,00
Metronidazol	67	100,50	1,50	67,00	1000,00
Cefotaxim	48	182,00	4,00	45,50	947,92
Clindamycin	10	16,80	1,80	9,33	933,33
Imipenem + Cilastatin	81	129,00	2,00	64,50	796,30
Tazobactam + Piperacillin	39	348,75	14,00	24,91	638,74
Piperacillin	42	366,00	14,00	26,14	622,45
Teicoplanin	64	15,80	0,40	39,50	617,19
Tobramycin	15	1,20	0,24	5,00	333,33

Tab.22: Übersicht über den Antibiotikaverbrauch. Sortiert nach DDD pro 1000 Patienten-Tage

*DDD-Wert = siehe Referenz WHO

** verwendete DDD = Gesamtdosis (g) / DDD-Wert

*** DDD pro 1000 Patienten-Tage = verwendete DDD / Antibiotika-Tage x 1000

3.3 Mikrobiologische Untersuchungsergebnisse

Im Rahmen der mikrobiologischen Untersuchungen wurden nur Gram-negative Bakterien berücksichtigt. So wurden insgesamt 238 Isolate gefunden, die in 22 verschiedene Spezies differenziert werden konnten. Die Proben wurden im Rahmen eines bei Erstaufnahme des Patienten auf die Station und anschließend alle 3 Tage durchgeführten Screenings gewonnen (s.Tab.23).

<u>Material</u>	<u>Anzahl</u>
Trachealsekret	89
Abstrich Leiste	57
Abstrich Nase	49
Abstrich Rachen	41
Wundabstrich	13
Spitze ZVK	12
Blutkultur aerob	5
Gewebe	5
Abstrich Abdomen	3
Drainagesekret	3
Abstrich Dekubitus	2
Bronchiallavage	2
Abstrich Abdomen Haut	1
Punktat	1

Tab.23: Entnahmeort der mikrobiologischen Untersuchungsmaterialien

Den höchsten Anteil an den Isolaten hatte mit 20,14% *Escherichia coli* gefolgt von *Pseudomonas spp.* (17,31%). Zur genauen Häufigkeitsverteilung siehe Tabelle 24.

<u>Isolat</u>	<u>Anzahl</u>	<u>Anteil in Prozent</u>
<i>Escherichia coli</i>	57	20,14%
<i>Pseudomonas spp.</i>	49	17,31%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	47	16,61%
<i>Pseudomonas putida</i>	2	0,71%
<i>Enterobacter spp.</i>	43	15,19%
<i>Enterobacter aerogenes</i>	2	0,71%
<i>Enterobacter cloacae</i>	41	14,49%
<i>Klebsiella spp.</i>	40	14,13%
<i>K. terrigena</i>	1	0,35%
<i>K. ornithinolytica</i>	2	0,71%
<i>K. pneum. ozeanae</i>	1	0,35%
<i>K. pneum. pneumoniae</i>	13	4,59%
<i>K. oxytoca</i>	23	8,13%
<i>Proteus spp.</i>	38	13,43%
<i>Proteus mirabilis</i>	30	10,60%
<i>Proteus vulgaris</i>	8	2,83%
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	33	11,66%
<i>Acinetobacter baumannii / calcoaceticus</i>	7	2,47%
<i>Morganella morganii</i>	4	1,41%
<i>Aeromonas hydrophilia / caviae</i>	3	1,06%
<i>Chryseomonas luteola</i>	2	0,71%
<i>Citrobacter freundii</i>	2	0,71%
<i>Flavimonas oryzihabitans</i>	2	0,71%
<i>Pantoea spp.</i>	1	0,35%
<i>Serratia odorifera</i>	1	0,35%
<i>Hafnia alvei</i>	1	0,35%

Tab.24: Verteilung der einzelnen Keimspezies nach Häufigkeit angeordnet

Im Anschluss an die biochemische Differenzierung wurden Resistenztestungen mit Hilfe von MICRONAUT[®]-Platten durchgeführt. Dabei wurde festgestellt, dass am häufigsten eine Resistenz gegenüber Cefoxitin auftrat. Insgesamt zeigten 52,65% aller Bakterien eine Resistenz gegenüber diesem Antibiotikum. Das Antibiotikum mit der niedrigsten Resistenzrate war Meropenem mit 7,42%. Details der Resistenzphänotypen sind in Tabelle 25 dargestellt.

Antibiotikum	Anzahl resistent	Anteil in Prozent
Cefoxitin	149	52,65%
Cefpodoxim-Proxetil	146	51,59%
Amoxicillin / Clavulansäure	144	50,88%
Piperacillin	140	49,47%
Cefotaxim	129	45,58%
Cefpodoxim-Proxetil / Clavulansäure	123	43,46%
Aztreonam	104	36,75%
Cefotaxim / Clavulansäure	102	36,04%
Ampicillin	89	31,45%
Piperacillin / Tazobactam	85	30,04%
Cefepim	64	22,61%
Ceftazidim / Clavulansäure	61	21,55%
Ceftazidim	54	19,08%
Cefepim / Clavulansäure	49	17,31%
Meropenem	21	7,42%

Tab.25: Ergebnisse der Resistenzbestimmung

Aufgrund des Resistenzmusters wurde eine Bestimmung aller Extended-spectrum Betalaktamase (ESBL)-bildenden Bakterien durchgeführt. Dabei konnte festgestellt werden, dass 20 Isolate einen ESBL-Phänotyp aufwiesen, was einem Anteil von 7,07% entspricht. ESBL wurden bei nur 2 der insgesamt 22 verschiedenen Spezies gefunden. Unter den *Escherichia coli* Isolaten waren 29,82% ESBL, bei *Klebsiella spp.* wurden 7,5% ESBL detektiert (s.Tab.26).

<u>Spezies</u>	<u>Anzahl</u>	<u>Anteil in Prozent</u>
insgesamt	20	7,07%
<i>Escherichia coli</i>	17	29,82%
<i>Klebsiella spp.</i>	3	7,50%

Tab.26: Gram-negative Isolate mit positivem ESBL Nachweis

Bei der Betrachtung von ESBL-bildenden Bakterien konnte beobachtet werden, dass ein Isolat Integron-positiv war. Dies entspricht einem Anteil von 5%. Bei dem Isolat handelt es sich um ein *Klebsiella pneumoniae ozeanae* Stamm, bei dem ein Integron der Klasse I gefunden werden konnte.

Um eine Übersicht über die Infektionswege, sowie zur Erkennung von neu aufgetretenen Intergrons, wurde mit Hilfe einer Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD) ein orientierender genotypischer Vergleich der einzelnen Isolate vorgenommen.

Bei den *Acinetobacter baumannii*-Isolaten wurden 3 genotypisch verschiedene Stämme nachgewiesen, wobei ein Stamm im Beobachtungszeitraum bei zwei weiteren Patienten aus der Besiedlungsflora nachweisbar war. Diese Patienten wurden nicht in benachbarten Boxen versorgt, daher ist eine nosokomiale Übertragung als weniger wahrscheinlich anzusehen. In den folgenden Tabellen (Tab.27-34) ist nur eine repräsentative Auswahl der gefundenen Stämme dargestellt.

Actinobacter baumannii

	<u>Entnahmedatum</u>	<u>Entnahmeort</u>	<u>Patient</u>	<u>Box Nr.</u>	<u>Beginn Studie</u>	<u>Ende Studie</u>	<u>Interpretation</u>
Stamm1	02.04.2003	TS	1	11	01.04.2003	08.04.2003	Erstisolat
	03.04.2003	TS	2	20	01.04.2003	15.05.2003	Nosokomial
	03.04.2003	Aabd	2	11	01.04.2003	08.04.2003	Nosokomial Copystrain
	14.04.2003	ARA	3	1	05.04.2003	09.04.2003	Nosokomial
	14.04.2003	ALE	3	12	11.04.2003	15.04.2003	Nosokomial Copystrain

Tab.27: RAPD-Genotypisierung von *Acinetobacter baumannii* Isolaten; Abkürzungen der Entnahmeorte siehe Tabelle 35

Bei den Isolaten von *Enterobacter cloacae* konnten insgesamt 9 klonal identische Stämme nachgewiesen werden, wobei ein Stamm bei fünf verschiedenen Patienten isoliert werden konnte. Auch hier waren die einzelnen Patienten nicht in räumlicher Nähe untergebracht. Zwei Patienten wurden von verschiedenen Stämmen besiedelt.

Enterobacter cloacae

	<u>Entnahmedatum</u>	<u>Entnahmeort</u>	<u>Patient</u>	<u>Box Nr.</u>	<u>Beginn Studie</u>	<u>Ende Studie</u>	<u>Interpretation</u>
Stamm 1	01.04.2003	ANA	1	20	01.04.2003	15.05.2003	Erstisolat
	07.04.2003	ALE	1	20	01.04.2003	15.05.2003	Copystrain
	07.04.2003	TS	1	20	01.04.2003	15.05.2003	Copystrain
	10.04.2003	ARA	1	20	01.04.2003	15.05.2003	Copystrain
	10.04.2003	WA	1	20	01.04.2003	15.05.2003	Copystrain
	14.04.2003	TS	1	20	01.04.2003	15.05.2003	Copystrain
	14.04.2003	ANA	1	20	01.04.2003	15.05.2003	Copystrain
	14.04.2003	ALE	1	20	01.04.2003	15.05.2003	Copystrain
	14.04.2003	ARA	1	20	01.04.2003	15.05.2003	Copystrain
	14.04.2003	TS	1	20	01.04.2003	15.05.2003	Copystrain
	17.04.2003	ANA	1	20	01.04.2003	15.05.2003	Copystrain
	22.04.2003	ANA	1	20	01.04.2003	15.05.2003	Copystrain

01.04.2003	WA	2	6	01.04.2003	11.04.2003	Nosokomial
01.04.2003	WA	2	6	01.04.2003	11.04.2003	Nosokomial Copystrain
10.04.2003	ALE	2	6	01.04.2003	11.04.2003	Nosokomial Copystrain
10.04.2003	TS	3	16	01.04.2003	15.05.2003	Nosokomial
10.04.2003	KTZV	4	4	02.04.2003	26.04.2003	Nosokomial
17.04.2003	ALE	5	8	08.04.2003	15.05.2003	Nosokomial

Tab.28: RAPD-Genotypisierung von *Enterobacter cloacae* Isolaten; Abkürzungen der Entnahmeorte siehe Tabelle 35

Unter den *Escherichia coli*- Isolaten (s.Abb.10) konnten insgesamt 16 verschiedene Klone nachgewiesen werden. Fünf dieser Stämme waren bei mehr als einem Patienten nachweisbar. Auch hier bestand keine direkte räumliche Nachbarschaft der Patienten als mögliche Erklärung für eine Transmission. Allerdings konnte bei 3 Stämmen im Verlauf ein Integron nachgewiesen werden, das beim Erstisolat noch nicht nachweisbar war.

Escherichia coli

	Entnahmedatum	Entnahmeort	Patient	Box Nr.	Beginn Studie	Ende Studie	Interpretation
Stamm 1	09.04.2003	WA	1	8	08.04.2003	15.05.2003	Erstisolat
	10.04.2003	ADK	2	4	02.04.2003	26.04.2003	Nosokomial
	10.04.2003	ALE	3	18	01.04.2003	17.04.2003	Nosokomial
Stamm 2	07.04.2003	ANA	1	2	05.04.2003	07.04.2003	Erstisolat
	07.04.2003	ALE	2	14	01.04.2003	10.04.2003	Nosokomial
	10.04.2003	KTZV	3	4	02.04.2003	26.04.2003	Nosokomial / Integron-positiv
	10.04.2003	TS	3	4	02.04.2003	26.04.2003	Nosokomial
Stamm 3	01.04.2003	ARA	1	5	01.04.2003	08.05.2003	Erstisolat
	07.04.2003	ARA	2	2	05.04.2003	07.04.2003	Copystrain
	10.04.2003	WA	3	8	08.04.2003	15.05.2003	Nosokomial
	14.04.2003	ALE	3	11	10.04.2003	14.04.2003	Nosokomial Copystrain
Stamm 5	03.04.2003	ALE	1	14	01.04.2003	10.04.2003	Erstisolat
	04.04.2003	TS	1	14	01.04.2003	10.04.2003	Copystrain
	04.04.2003	BLV	1	14	01.04.2003	10.04.2003	Copystrain / Integron-positiv
	04.04.2003	WA	2	11	18.04.2003	24.04.2003	Nosokomial
	09.04.2003	BLV	3	4	02.04.2003	26.04.2003	Nosokomial
	22.04.2003	ALE	4	3	17.04.2003	27.04.2003	Nosokomial
Stamm 7	03.04.2003	ALE	1	18	01.04.2003	17.04.2003	Erstisolat
	07.04.2003	ALE	1	18	01.04.2003	17.04.2003	Copystrain
	14.04.2003	ALE	1	18	01.04.2003	17.04.2003	Copystrain
	28.04.2003	TS	2	20	01.04.2003	15.05.2003	Nosokomial
	28.04.2003	TS	2	20	01.04.2003	15.05.2003	Nosokomial Copystrain
	08.05.2003	TS	2	20	01.04.2003	15.05.2003	Nosokomial Copystrain
	08.05.2003	ARA	2	20	01.04.2003	15.05.2003	Nosokomial Copystrain
	05.05.2003	TS	2	20	01.04.2003	15.05.2003	Nosokomial Copystrain
	05.05.2003	ANA	2	20	01.04.2003	15.05.2003	Nosokomial Copystrain
	05.05.2003	TS	2	20	01.04.2003	15.05.2003	Nosokomial Copystrain
	12.05.2003	WA	2	20	01.04.2003	15.05.2003	Nosokomial Copystrain

04.04.2003	KTZV	3	14	01.04.2003	10.04.2003	Nosokomial / Integron-positiv
10.04.2003	ALE	3	14	01.04.2003	10.04.2003	Nosokomial Copystrain
07.04.2003	ABAH	4	8	08.04.2003	15.05.2003	Nosokomial
24.04.2003	ALE	5	1	24.04.2003	04.05.2003	Nosokomial

Tab.29: RAPD-Genotypisierung von *Escherichia coli* Isolaten; Abkürzungen der Entnahmeorte siehe Tabelle 35

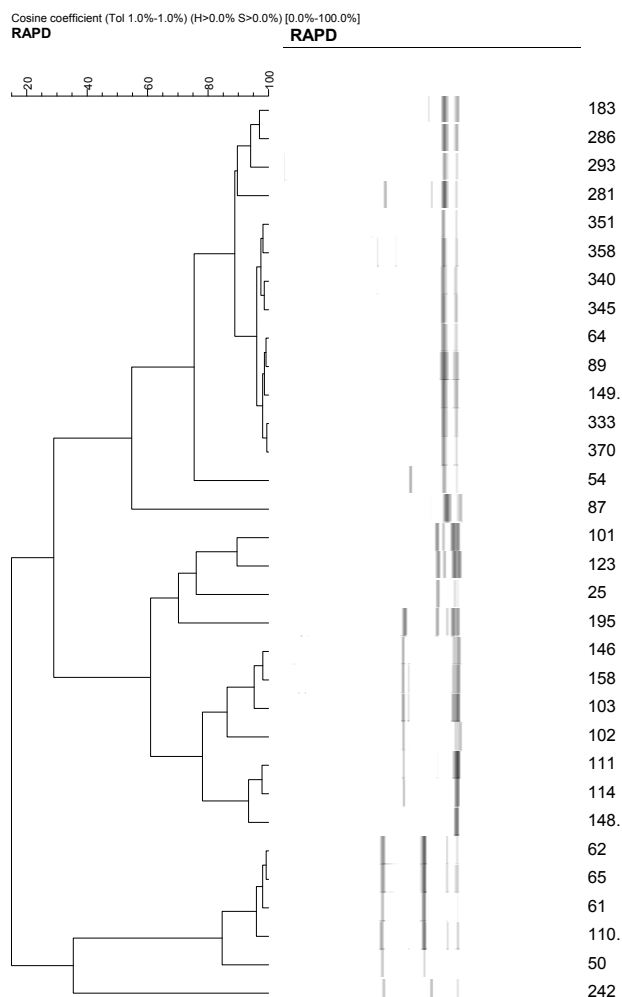


Abb.10: Beispiel der dendrografischen Unterscheidung verschiedener RAPD-Bandenmuster bei *Escherichia coli*

Es konnten 6 verschiedene *Klebsiella oxytoca* Stämme nachgewiesen werden. Bemerkenswert ist hier, dass ein Klon dieser Spezies bei 6 verschiedenen Patienten nachgewiesen werden konnte. Drei der Patienten lagen zeitlich nacheinander in einer bestimmten Box.

Klebsiella oxytoca

	<u>Entnahmedatum</u>	<u>Entnahmeort</u>	<u>Patient</u>	<u>Box Nr.</u>	<u>Beginn Studie</u>	<u>Ende Studie</u>	<u>Interpretation</u>
Stamm 1	07.04.2003	ARA	1	3	10.04.2003	25.04.2003	Erstisolat / Integron-positiv
	10.04.2003	TS	1	19	10.04.2003	25.04.2003	Copystain / Integron-positiv
	10.04.2003	ARA	1	19	10.04.2003	25.04.2003	Copystain / Integron-positiv
	10.04.2003	TS	1	19	10.04.2003	25.04.2003	Copystain / Integron-positiv
	10.04.2003	ANA	1	19	10.04.2003	25.04.2003	Copystain / Integron-positiv
	14.04.2003	TS	1	19	10.04.2003	25.04.2003	Copystain / Integron-positiv
	17.04.2003	ARA	1	19	10.04.2003	25.04.2003	Copystain / Integron-positiv
	28.04.2003	ALE	1	4	27.04.2003	29.04.2003	Copystain / Integron-positiv
	28.04.2003	ARA	1	4	27.04.2003	29.04.2003	Copystain / Integron-positiv
	07.04.2003	ALE	2	17	01.04.2003	07.04.2003	Nosokomial / Integron-positiv
	07.04.2003	ARA	2	17	01.04.2003	07.04.2003	Copystain / Integron-positiv
	10.04.2003	ARA	3	6	01.04.2003	11.04.2003	Nosokomial / Integron-positiv
	14.04.2003	ARA	4	3	08.04.2003	15.04.2003	Nosokomial / Integron-positiv
	22.04.2003	ANA	5	3	17.04.2003	27.04.2003	Nosokomial / Integron-positiv
	12.05.2003	TS	6	8	08.04.2003	15.05.2003	Nosokomial / Integron-positiv

Tab.30: RAPD-Genotypisierung von *Klebsiella oxytoca* Isolaten; Abkürzungen der Entnahmeorte siehe Tabelle 35

Unter den *Morganella morganii* Isolaten konnten 2 Stämme nachgewiesen werden. Ein Stamm wurde bei 3 verschiedenen Patienten gefunden, wobei 2 Patienten nacheinander in der gleichen Box gelegen haben.

Morganella morganii

	<u>Entnahmedatum</u>	<u>Entnahmeort</u>	<u>Patient</u>	<u>Box Nr.</u>	<u>Beginn Studie</u>	<u>Ende Studie</u>	<u>Interpretation</u>
<i>gleich</i>							
Stamm 1	07.04.2003	ALE	1	17	01.04.2003	07.04.2003	Erstisolat
	10.04.2003	TS	2	17	10.04.2003	13.04.2003	Nosokomial
	10.04.2003	TS	3	12	04.04.2003	09.04.2003	Nosokomial

Tab.31: RAPD-Genotypisierung von *Morganella morganii* Isolaten; Abkürzungen der Entnahmeorte siehe Tabelle 35

Bei den *Proteus mirabilis* Isolaten wurden insgesamt 6 Stämme nachgewiesen, wobei ein Stamm bei 3 verschiedenen Patienten nachgewiesen wurde. Zwei dieser Patienten lagen in benachbarten Boxen.

Proteus mirabilis

	<u>Entnahmedatum</u>	<u>Entnahmeort</u>	<u>Patient</u>	<u>Box Nr.</u>	<u>Beginn Studie</u>	<u>Ende Studie</u>	<u>Interpretation</u>
Stamm 1	14.04.2003	ANA	1	7	03.04.2003	15.05.2003	Erstisolat
	14.04.2003	ALE	1	7	03.04.2003	15.05.2003	Copystrain
	17.04.2003	TS	1	7	03.04.2003	15.05.2003	Copystrain
	17.04.2003	ANA	1	7	03.04.2003	15.05.2003	Copystrain
	17.04.2003	ALE	1	7	03.04.2003	15.05.2003	Copystrain
	14.04.2003	ALE	2	15	10.04.2003	13.04.2003	Nosokomial
	14.04.2003	ALE	3	6	15.04.2003	17.04.2003	Nosokomial

Tab.32: RAPD-Genotypisierung von *Proteus mirabilis* Isolaten; Abkürzungen der Entnahmeorte siehe Tabelle 35

Die isolierten *Pseudomonas aeruginosa* wiesen im genotypischen Vergleich insgesamt 14 verschiedene Klone auf. Drei dieser Stämme konnten jeweils bei zwei verschiedenen Patienten nachgewiesen werden. Bei zwei weiteren Stämmen konnte im Verlauf ein Integron nachgewiesen werden, welches bei dem Erstisolat nicht vorhanden gewesen war.

Pseudomonas aeruginosa

	<u>Entnahmedatum</u>	<u>Entnahmeort</u>	<u>Patient</u>	<u>Box Nr.</u>	<u>Beginn Studie</u>	<u>Ende Studie</u>	<u>Interpretation</u>
Stamm 1	02.05.2003	TS	1	5	01.04.2003	08.05.2003	Erstisolat
	02.05.2003	TS	1	5	01.04.2003	08.05.2003	Copystrain / Integron-positiv
	05.05.2003	TS	1	5	01.04.2003	08.05.2003	Copystrain
	08.05.2003	ALE	1	5	01.04.2003	08.05.2003	Copystrain
	08.05.2003	ANA	1	5	01.04.2003	08.05.2003	Copystrain
Stamm 7	17.04.2003	ALE	1	19	10.04.2003	25.04.2003	Erstisolat
	24.04.2003	TS	1	6	20.04.2003	27.04.2003	Copystrain
	28.04.2003	ALE	2	7	03.04.2003	15.05.2003	Nosokomial
Stamm 9	03.04.2003	ALE	1	11	01.04.2003	08.04.2003	Erstisolat
	02.04.2003	TS	1	11	01.04.2003	08.04.2003	Copystrain
	03.04.2003	ANA	1	11	01.04.2003	08.04.2003	Copystrain
	03.04.2003	ALE	2	20	01.04.2003	15.05.2003	Nosokomial
	07.04.2003	ALE	1	11	01.04.2003	08.04.2003	Copystrain
Stamm 10	27.04.2003	WA	1	19	27.04.2003	15.05.2003	Erstisolat
	12.05.2003	WA	1	19	27.04.2003	15.05.2003	Copystrain
	12.05.2003	TS	1	19	27.04.2003	15.05.2003	Copystrain
	12.05.2003	WA	1	19	27.04.2003	15.05.2003	Copystrain
	13.05.2003	ANA	1	19	27.04.2003	15.05.2003	Copystrain
	13.05.2003	ANA	2	9	22.04.2003	15.05.2003	Nosokomial

Tab.33: RAPD-Genotypisierung von *Pseudomonas aeruginosa* Isolaten; Abkürzungen der Entnahmeorte siehe Tabelle 35

Insgesamt 9 Stämme der Spezies *Stenotrophomonas maltophilia* wurden nachgewiesen, wobei 3 Stämme bei verschiedenen Patienten nachgewiesen werden konnten. Auch hier bestand keine räumliche Nähe zwischen den Boxen, in denen die Patienten untergebracht waren.

Stenotrophomonas maltophilia

	<u>Entnahmedatum</u>	<u>Entnahmeort</u>	<u>Patient</u>	<u>Box Nr.</u>	<u>Beginn Studie</u>	<u>Ende Studie</u>	<u>Interpretation</u>
Stamm 1	22.04.2003	TS	1	7	03.04.2003	15.05.2003	Erstisolat
	22.04.2003	TS	1	7	03.04.2003	15.05.2003	Copystrain
	24.04.2003	TS	1	7	03.04.2003	15.05.2003	Copystrain
	06.05.2003	ANA	1	7	03.04.2003	15.05.2003	Copystrain
	08.05.2003	TS	2	20	01.04.2003	15.05.2003	Nosokomial
Stamm 2	25.04.2003	KTZV	1	16	01.04.2003	15.05.2003	Erstisolat
	12.05.2003	ANA	2	20	01.04.2003	15.05.2003	Nosokomial
Stamm 3	01.04.2003	TS	1	20	01.04.2003	15.05.2003	Erstisolat
	07.04.2003	TS	1	20	01.04.2003	15.05.2003	Copystrain
	07.04.2003	TS	1	20	01.04.2003	15.05.2003	Copystrain
	17.04.2003	ANA	1	20	01.04.2003	15.05.2003	Copystrain
	28.04.2003	TS	1	20	01.04.2003	15.05.2003	Copystrain
	14.04.2003	ANA	2	16	01.04.2003	15.05.2003	Nosokomial
	17.04.2003	ARA	2	16	01.04.2003	15.05.2003	Nosokomial / Copystrain
	22.04.2003	TS	2	16	01.04.2003	15.05.2003	Nosokomial / Copystrain
	22.04.2003	ANA	2	16	01.04.2003	15.05.2003	Nosokomial / Copystrain
	25.04.2003	KTZV	2	16	01.04.2003	15.05.2003	Nosokomial / Copystrain
	25.04.2003	KTZV	2	16	01.04.2003	15.05.2003	Nosokomial / Copystrain
	02.04.2003	TS	3	10	01.04.2003	06.04.2003	Nosokomial
	02.04.2003	TS	3	10	01.04.2003	06.04.2003	Nosokomial / Copystrain
	12.04.2003	TS	3	11	18.04.2003	24.04.2003	Nosokomial / Copystrain

Tab.34: RAPD-Genotypisierung von *Stenotrophomonas maltophilia* Isolaten; Abkürzungen der Entnahmeorte siehe Tabelle 35

TS	Trachelsekret
Aabd	Abstrich Abdomen
ARA	Abstrich Rachen
ALE	Abstrich Leiste
ANA	Abstrich Nase
WA	Wundabstrich
KTZV	Katheterspitze ZVK
ADK	Abstrich Daerkatheter
BLV	Bronchiallavage
ABAH	Abstrich Bauchhaut

Tab.35: Abkürzung der Entnahmeorte

Für die Integrondetektion wurde ein PCR-Nachweisverfahren eingesetzt. Dabei wurden die Integronklasse bestimmt.

Insgesamt ließen sich bei 21 Bakterien Integrone der Klasse 1 nachweisen. Das entspricht einem Anteil von 7,42% Integron-haltigen Isolaten am Gesamtkollektiv. Bei 40% aller *Klebsiella spp.* wurde ein Integron der Klasse 1 nachgewiesen. Je ein Klasse 1 Integron konnte bei 3 *Escherichia coli* Isolaten, sowie bei 2 *Pseudomonas spp.* entdeckt werden (s.Tab.3). Bei Integron-haltigen Isolaten wurde mit Hilfe von Sequenzierungen die Zusammensetzung der enthaltenen Resistenzgene in der Genkassettenregion untersucht.

	<u>Anzahl der Isolate</u>	<u>Anteil in Prozent</u>
insgesamt	21	7,42%
<i>Escherichia coli</i>	3	5,26%
<i>Klebsiella spp.</i>	16	40,00%
<i>Pseudomonas spp.</i>	2	4,08%

Tab.36: Nachweis von Klasse 1 Integrone

Die Häufigkeit von Klasse 2 Integrone war im Vergleich zu Klasse 1 Integron nur geringfügig niedriger. So wurde in 6,01% der Isolate ein Integron der Klasse 2 gefunden. Hierbei waren ebenfalls die *Klebsiella spp.* (37,5%) am häufigsten vertreten (s.Tab.37).

	<u>Anzahl der Isolate</u>	<u>Anteil in Prozent</u>
insgesamt	17	6,01%
<i>Escherichia coli</i>	1	4,35%
<i>Klebsiella spp.</i>	15	37,50%
<i>Pseudomonas spp.</i>	1	2,04%

Tab.37: Nachweis von Klasse 2 Integrone

Bei insgesamt 16 Isolaten (37,5% aller *Klebsiella* spp. Isolate) wurden Integrone der Klasse 1 und 2 nachgewiesen.

	<u>Anzahl der Isolate</u>	<u>Anteil in Prozent</u>
insgesamt	16	5,65%
<i>Klebsiella</i> spp.	15	37,50%
<i>Pseudomonas</i> spp.	1	2,04%

Tab.38: Nachweis von Klasse 1 und 2 Integrone

Bei der Materialherkunft war auffällig, dass in 68,18% aller Integron-haltigen Isolate aus dem Respirationstrakt stammten (s.Tab.39).

<u>Material</u>	<u>Anzahl</u>	<u>Anteil in Prozent</u>
Abstrich Rachen	8	36,36%
Abstrich Leiste	4	18,18%
Trachealsekret	4	18,18%
Abstrich Nase	3	13,64%
Spitze ZVK	2	9,09%
Blutkultur aerob	1	4,55%

Tab.39: Verteilung des Materials mit Integron-positiven Isolaten (grau unterlegt: Material aus dem Respirationstrakt)

Die Analyse der phänotypischen Resistenzbestimmungen zeigt bei Integron-positiven Isolaten, dass diese Erreger alle gegenüber Ampicillin resistent waren. Der genetische Hintergrund hierfür liegt aber nicht bei Resistenzgenen, die integronvermittelt sind, sondern bei chromosomalen AmpC Resistenzgenen, die bei *Klebsiellen* und *Pseudomonas* zur festen Resistenzgenausstattung gehören. 95,45% aller Integron-positiven Isolate hatten eine Resistenz gegenüber Piperacillin allein ohne den Penicillinaseinhibitor Tazobactam. Erwartungsgemäß zeigte sich, dass nur 4,55% aller Integron-positiven Isolate resistent gegenüber Meropenem waren (s.Tab.40).

Spezies	Wahrscheinlichkeit	Integrase	Amp	Amo/Cla	Cef	Cez
<i>Escherichia coli</i>	99,8%	IntI1	resistent	resistent	2	0,5
<i>Escherichia coli</i>	99,8%	IntI1	resistent	resistent	2	1
<i>K.pneum.ozeanae</i>	86,1%	IntI1	resistent	32/2	16 (intermediär)	16 (intermediär)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	97,4%	IntI1 + IntI2	resistent	resistent	4	1
<i>Klebsiella oxytoca</i>	97,4%	IntI1 + IntI2	resistent	resistent	4	2
<i>Klebsiella oxytoca</i>	98,6%	IntI1 + IntI2	resistent	resistent	2	1
<i>Klebsiella oxytoca</i>	97,4%	IntI1 + IntI2	resistent	resistent	4	1
<i>K.pneum.pneumoniae</i>	97,6%	IntI1 + IntI2	resistent	4/2	2	0,25
<i>Klebsiella oxytoca</i>	97,4%	IntI1 + IntI2	resistent	resistent	2	1
<i>Klebsiella oxytoca</i>	97,4%	IntI1 + IntI2	resistent	resistent	2	0,5
<i>Klebsiella oxytoca</i>	97,4%	IntI1 + IntI2	resistent	resistent	4	1
<i>Escherichia coli</i>	89,6%	IntI2	resistent	64/2	2	1
<i>Escherichia coli</i>	99,8%	IntI1	resistent	64/2	2	0,25
<i>Klebsiella oxytoca</i>	97,4%	IntI1 + IntI2	resistent	resistent	8 (intermediär)	2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99,9%	IntI1	resistent	resistent	2	1
<i>Klebsiella oxytoca</i>	97,4%	IntI1 + IntI2	resistent	resistent	2	1
<i>Klebsiella oxytoca</i>	97,4%	IntI1 + IntI2	resistent	resistent	2	1
<i>Klebsiella oxytoca</i>	97,4%	IntI1 + IntI2	resistent	resistent	2	16 (intermediär)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	97,4%	IntI1 + IntI2	resistent	resistent	2	2
<i>Klebsiella oxytoca</i>	97,4%	IntI1 + IntI2	resistent	resistent	2	2
<i>Klebsiella oxytoca</i>	97,4%	IntI1 + IntI2	resistent	resistent	2	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99,9%	IntI1 + IntI2	resistent	resistent	resistent	resistent

Tab.40: Phänotypische Resistenzbestimmung Integron-haltiger Isolate; Alle Resistenztestungs- MHK-Werte in µg/ml; Abkürzungen am Tabellenende erläutert

Spezies	Wahrscheinlichkeit	Integrase	Cef/Cla	Cez/Cla	Cex/Cla	Azt	Cex
<i>Escherichia coli</i>	99,8%	IntI1	0,5/4	0,25/4	0,5/4	1	0,5
<i>Escherichia coli</i>	99,8%	IntI1	0,5/4	0,5/4	0,5/4	1	0,5
<i>K.pneum.ozeanae</i>	86,1%	IntI1	0,5/4	0,25/4	0,5/4	8	resistent
<i>Klebsiella oxytoca</i>	97,4%	IntI1 + IntI2	0,5/4	0,5/4	0,5/4	resistent	4 (intermediär)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	97,4%	IntI1 + IntI2	0,5/4	0,5/4	0,5/4	resistent	4 (intermediär)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	98,6%	IntI1 + IntI2	0,5/4	0,5/4	0,5/4	resistent	4 (intermediär)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	97,4%	IntI1 + IntI2	0,5/4	0,5/4	0,5/4	resistent	4 (intermediär)
<i>K.pneum.pneumoniae</i>	97,6%	IntI1 + IntI2	0,5/4	0,25/4	0,5/4	1	0,5
<i>Klebsiella oxytoca</i>	97,4%	IntI1 + IntI2	0,5/4	0,5/4	0,5/4	resistent	2
<i>Klebsiella oxytoca</i>	97,4%	IntI1 + IntI2	0,5/4	0,25/4	0,5/4	resistent	2
<i>Klebsiella oxytoca</i>	97,4%	IntI1 + IntI2	0,5/4	0,25/4	0,5/4	resistent	4 (intermediär)
<i>Escherichia coli</i>	89,6%	IntI2	0,5/4	0,25/4	0,5/4	resistent	0,5
<i>Escherichia coli</i>	99,8%	IntI1	0,5/4	0,25/4	0,5/4	1	0,5
<i>Klebsiella oxytoca</i>	97,4%	IntI1 + IntI2	resistent	4/4	2/4	resistent	4 (intermediär)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99,9%	IntI1	0,5/4	0,5/4	0,5/4	resistent	2
<i>Klebsiella oxytoca</i>	97,4%	IntI1 + IntI2	0,5/4	0,5/4	0,5/4	resistent	4 (intermediär)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	97,4%	IntI1 + IntI2	0,5/4	1/4	0,5/4	resistent	4 (intermediär)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	97,4%	IntI1 + IntI2	0,5/4	8/4	0,5/4	resistent	2
<i>Klebsiella oxytoca</i>	97,4%	IntI1 + IntI2	0,5/4	0,25/4	0,5/4	resistent	2
<i>Klebsiella oxytoca</i>	97,4%	IntI1 + IntI2	0,5/4	0,5/4	0,5/4	resistent	2
<i>Klebsiella oxytoca</i>	97,4%	IntI1 + IntI2	0,5/4	0,5/4	0,5/4	resistent	2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99,9%	IntI1 + IntI2	resistent	resistent	resistent	16	resistent

Tab.40: Fortsetzung

Spezies	Wahrscheinlichkeit	Integrase	Cefp-Pro	Pip	Cefp-Pro/Cla	Pip/Taz
<i>Escherichia coli</i>	99,8%	Intl1	1	resistent	1/4	resistent
<i>Escherichia coli</i>	99,8%	Intl1	1	resistent	1/4	resistent
<i>K.pneum.ozeanae</i>	86,1%	Intl1	resistent	resistent	0,5/4	8/4
<i>Klebsiella oxytoca</i>	97,4%	Intl1 + Intl2	16	resistent	2/4	resistent
<i>Klebsiella oxytoca</i>	97,4%	Intl1 + Intl2	16	resistent	1/4	resistent
<i>Klebsiella oxytoca</i>	98,6%	Intl1 + Intl2	8	resistent	0,5/4	resistent
<i>Klebsiella oxytoca</i>	97,4%	Intl1 + Intl2	16	resistent	1/4	resistent
<i>K.pneum.pneumoniae</i>	97,6%	Intl1 + Intl2	0,25	4	0,5/4	8/4 (intermediär)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	97,4%	Intl1 + Intl2	8	resistent	1/4	resistent
<i>Klebsiella oxytoca</i>	97,4%	Intl1 + Intl2	8	resistent	0,25/4	resistent
<i>Klebsiella oxytoca</i>	97,4%	Intl1 + Intl2	8	resistent	0,5/4	resistent
<i>Escherichia coli</i>	89,6%	Intl2	4	resistent	0,25/4	16/4 (intermediär)
<i>Escherichia coli</i>	99,8%	Intl1	2	resistent	0,25/4	resistent
<i>Klebsiella oxytoca</i>	97,4%	Intl1 + Intl2	16	resistent	8/4	resistent
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99,9%	Intl1	16	resistent	1/4	resistent
<i>Klebsiella oxytoca</i>	97,4%	Intl1 + Intl2	8	resistent	0,5/4	resistent
<i>Klebsiella oxytoca</i>	97,4%	Intl1 + Intl2	8	resistent	1/4	resistent
<i>Klebsiella oxytoca</i>	97,4%	Intl1 + Intl2	8	resistent	1/4	resistent
<i>Klebsiella oxytoca</i>	97,4%	Intl1 + Intl2	8	resistent	0,25/4	resistent
<i>Klebsiella oxytoca</i>	97,4%	Intl1 + Intl2	8	resistent	0,25/4	resistent
<i>Klebsiella oxytoca</i>	97,4%	Intl1 + Intl2	8	resistent	0,25/4	resistent
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99,9%	Intl1 + Intl2	resistent	resistent	resistent	resistent

Tab.40: Fortsetzung

Spezies	Wahrscheinlichkeit	Integrase	Mer	Cefo
<i>Escherichia coli</i>	99,8%	Intl1	0,25	8 (intermediär)
<i>Escherichia coli</i>	99,8%	Intl1	0,25	8 (intermediär)
<i>K.pneum.ozeanae</i>	86,1%	Intl1	0,25	16
<i>Klebsiella oxytoca</i>	97,4%	Intl1 + Intl2	0,25	8 (intermediär)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	97,4%	Intl1 + Intl2	0,25	8 (intermediär)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	98,6%	Intl1 + Intl2	0,25	8 (intermediär)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	97,4%	Intl1 + Intl2	0,25	4
<i>K.pneum.pneumoniae</i>	97,6%	Intl1 + Intl2	0,25	resistent
<i>Klebsiella oxytoca</i>	97,4%	Intl1 + Intl2	0,25	4
<i>Klebsiella oxytoca</i>	97,4%	Intl1 + Intl2	0,25	8 (intermediär)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	97,4%	Intl1 + Intl2	0,25	8 (intermediär)
<i>Escherichia coli</i>	89,6%	Intl2	0,25	4
<i>Escherichia coli</i>	99,8%	Intl1	0,25	resistent
<i>Klebsiella oxytoca</i>	97,4%	Intl1 + Intl2	0,25	4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99,9%	Intl1	0,25	4
<i>Klebsiella oxytoca</i>	97,4%	Intl1 + Intl2	0,25	4
<i>Klebsiella oxytoca</i>	97,4%	Intl1 + Intl2	0,25	4
<i>Klebsiella oxytoca</i>	97,4%	Intl1 + Intl2	0,25	8 (intermediär)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	97,4%	Intl1 + Intl2	0,25	4
<i>Klebsiella oxytoca</i>	97,4%	Intl1 + Intl2	0,25	4
<i>Klebsiella oxytoca</i>	97,4%	Intl1 + Intl2	0,25	4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99,9%	Intl1 + Intl2	resistent	resistent

Tab.40: Fortsetzung

Amp	Ampicillin
Amo/Cla	Amoxicillin / Clavulansäure
Cef	Cefepim
Cez	Ceftazidim
Cef/Cla	Cefepim / Clavulansäure
Cez/Cla	Ceftazidim / Clavulansäure
Cex/Cla	Cefotaxim / Clavulansäure
Azt	Aztreonam

Cex	Cefotaxim
Cefp-Pro	Cefpodoxim-Proxetil
Pip	Piperacillin
Cefp-Pro/Cla	Cefpodoxim-Proxetil/Clavulansäure
Pip/Taz	Piperacillin /Tazobactam
Mer	Meropenem
Cefo	Cefoxitin

Tab.40A: Abkürzungen der Tab.40

3.4 Statistische Auswertung der Ergebnisse

Die 22 Integron-positiven Isolate traten bei insgesamt 9 verschiedenen Patienten auf, was einen Anteil von 15,25% am Gesamtkollektiv aller Patienten entspricht. Das durchschnittliche Alter dieser Patienten lag bei 74,84 Jahren und somit 11,20 Jahre über dem des Gesamtkollektivs. Die durchschnittliche Liegedauer auf der Intensivstation bis zum Auftreten Integron-positiven Isolaten betrug 10,23 Tage.

	<u>Integron-positive Patienten</u>	<u>Patienten ohne integronhaltige Bakterien</u>
Anzahl	9	52
Alter [Jahre]	74,84	63,64
durchschnittliche Liegedauer [Tage]	15,56	8,78
durchschnittliche Liegedauer bis zum Auftreten von Int+ Isolaten [Tage]	10,23	-

Tab.41: Vergleich von Altersverteilung und Liegedauer bei Patienten mit und ohne Integronnachweis

Bei der Suche nach einer Korrelation zwischen Transmissionsquellen aus der belebten und unbelebten Umgebung der Patienten und dem Auftreten von Integron-positiven Isolaten waren verschiedene statistische Modelle einsetzbar. Nach Diskussion und eingehender Beratung mit dem betreuenden Statistiker der Studie entschieden wir uns für das so genannte

Akaike Information Criterion (AIC). Bei AIC handelt es sich um das historisch älteste Informationskriterium zur Auswahl eines Modells. Dabei gehen die Anpassungsgüte des geschätzten Modells an die vorliegenden empirischen Daten (Stichprobe) und Komplexität des Modells, gemessen an der Anzahl der Parameter, in die Beurteilung ein. Die Anzahl der untersuchten Parameter selbst wird dabei berücksichtigt, da sonst umfassende Modelle mit vielen Parametern bevorzugt würden. In diesem Sinne ist das korrigierte Bestimmtheitsmaß, das auf [Theil](#) (1970) zurückgeht, ein Vorläufer der heute bekannten Informationskriterien. Allen heute verwendeten Informationskriterien ist gleich, dass sie in zwei verschiedenen Formulierungen vorliegen. Entweder ist das Maß für die Anpassungsgüte als die maximale Likelihood (engl. *maximale Wahrscheinlichkeit*, bezeichnet in der Statistik ein Schätzverfahren) oder als die minimale Varianz der Residuen formuliert. Hieraus ergeben sich unterschiedliche Interpretationsmöglichkeiten. Bei maximaler Wahrscheinlichkeit ist das Modell "am aussagekräftigsten", bei dem das jeweilige Informationskriterium den höchsten Wert hat (die als nachteilig gewichtete Anzahl der Parameter muss dabei abgezogen werden). Bei der minimalen Varianz bietet das Modell mit dem niedrigsten Wert des Informationskriteriums die beste Aussage zum gesuchten relativen Risiko (die Anzahl der Parameter muss "strafend" addiert werden).

Mit Hilfe des AIC konnte eine leicht erhöhte Odds Ratio (die Odds Ratio beinhaltet die relativen Chancen für das Ereignis bei Vorhandensein des Faktors im Vergleich zum Nichtvorhandensein des Faktors) für die Liegedauer der Magensonde und Auftreten von Integron-positiven Isolaten errechnet werden. Der Wert liegt 10% über der erwarteten Wahrscheinlichkeit und ist somit signifikant. Die statistische Signifikanz (p-Wert) sagt aus, wie groß die Wahrscheinlichkeit ist, dass der gemessene Unterschied zufällig ist. Ein p-Wert < 0.05 bedeutet, dass die Wahrscheinlichkeit kleiner als 5% ist, dass der gemessene Unterschied zwischen den zwei Vergleichsgruppen (z.B. 5% weniger Blutungen in der Gruppe 1 als in der Gruppe 2) nur auf Zufall beruht. Der p-Wert für die Liegedauer der Magensonde liegt in diesem Fall bei 0,1454874. Da das von uns verwendete AIC allerdings **nur** bei nicht signifikanten p-Werten valide ist, konnte somit ein Bezug zwischen der Liegedauer der Magensonde und Auftreten von Integron-positiven Isolaten statistisch belegt werden. Alle anderen untersuchten Beziehungen, die in Tabellen 11-31 dargestellt sind, ergaben keine signifikante Relation zwischen dem Nachweis von Integrons und den in der Studie dokumentierten klinisch-infektiologischen Parametern.

4. Diskussion

4.1 Einleitung

Die vorliegende Studie untersucht das Vorkommen von Integron-haltigen Erregern bei einem Patientenkollektiv einer chirurgischen Intensivstation.

4.2 Vorarbeiten zur Epidemiologie von Integronherkunft und –verbreitung

Die bisher zur Verbreitung von Integrons durchgeführten Studien konnten belegen, dass Integrons aus der unbelebten Umwelt vor allem über Trinkwasser und tierische Nahrungsmittel^{20,21,35} und damit über die Nahrungskette Eingang in die Besiedlungsflora von Patienten finden. Im Krankenhaus können Integron-haltige Gram-negative Bakterien eingeschleppt und verbreitet werden und sind als multiresistente Erreger von klinischer Bedeutung. Als besonderer Problembereich hat sich dabei die Intensivstation herausgestellt⁴⁸. Als mögliche Ursachen hierfür oder Kofaktoren, die die Verbreitung von Integron-vermittelter Resistenz fördern werden das dort betreute schwerkranke, im Durchschnitt ältere Patientengut und der hohe Antibiotikaselektionsdruck angenommen, der den Resistenzwerb nosokomialer Erreger begünstigt. Es kommt hinzu, dass die hohe Zahl an Pflegekontakten eine Transmission solcher resistenten Isolate wahrscheinlicher macht als bei einem vergleichbaren stationären Aufenthalt unter nicht- intensivmedizinischen Bedingungen.

4.3 Schwerpunkte dieser Studie

Als Ausgangspunkt dieser Studie diente daher die Annahme, dass in der Besiedlungsflora von Patienten der beobachteten Intensivstation ein erhöhtes Auskommen von Integron-haltigen Bakterien beobachtbar sein würde. Die Bestandaufnahme dieses Erregertyps wurde begleitet von der lückenlosen Dokumentation des zu diesem Zeitraum vorliegenden Antibiotikaselektionsdruckes und von der Score-gestützten Quantifizierung der

Erkrankungsschwere dieser Patienten. Die Erfassung aller infektiologisch relevanten Parameter der individuellen Patienten diente weiterhin dazu, mögliche relative Risiken aus den einzelnen Patientenkasuistiken abzuleiten. Abschließend wurde mit Hilfe eines einfachen genotypischen Vergleichs aller Gram-negativen Isolate versucht, unter Berücksichtigung der jeweiligen räumlichen Unterbringung des Patienten, mögliche Rückschlüsse über die Verbreitungswege Integron-haltiger Erreger zu ziehen.

Die Intensivstation wurde während des gesamten Zeitraumes nach den im Hygieneplan festgelegten Vorgaben mehrmals täglich reinigend desinfiziert. Vor diesem Hintergrund wurde davon abgesehen, die in der unbelebten Umgebung des Patienten nachweisbaren Erreger mit in die Untersuchung einzubeziehen. Dabei gingen wir nach Rücksprache mit dem betreuenden Krankenhaushygieniker davon aus, dass solche Bakterienisolate von (kurzzeitig) besiedelten Flächen nicht von infektiologischer Relevanz sind.

In einer Beobachtungszeit von nur 45 Tagen wurden sämtliche verfügbaren Untersuchungsmaterialien aus der Besiedlungsflora der Patienten und aus Abstrichmaterialien der mikrobiologisch-infektiologischen Untersuchungen auf das Vorliegen von Gram-negativen Erregern mit nachweisbaren Resistenzintegrons der Klassen 1 und 2 untersucht. Der Nachweis wurde auf diese beiden Klassen beschränkt, da nahezu alle Resistenzintegrons zu einer dieser beiden Klassen gehören²¹.

Obwohl der kurze Beobachtungszeitraum im Gegensatz zu einer Langzeitbeobachtung des Vorkommens von Integrons den Nachteil einer Momentaufnahme im Sinne einer Punktprävalenz in Kauf nimmt, lag der Fokus der Untersuchungen bei der vollständigen Dokumentation aller potenziellen Risikofaktoren aus der Umgebung der Patienten mit der maximalen für diesen Zeitraum erreichbaren Datenqualität.

Vorarbeiten anderer Arbeitsgruppen (Prof. Franz-Josef Schmitz) hatten für ein ähnliches Patientengut der Universitätsklinik Düsseldorf in einem mehrjährigen Untersuchungszeitraum bereits belegt, dass Integrons der Klasse 1 eine bedeutende Rolle bei der Gram-negativen Resistenzentwicklung gespielt hatten⁶⁶. Der Anteil Integron-haltiger *Enterobacteriaceae* in Blutkulturen lag in der Studie von Schmitz *et al.* im Jahr 1993/94 bei 4,7% (von 256 untersuchten Isolaten), im Jahr 1997/98 stieg er auf 15,9% (bei 287 untersuchten Isolaten). Die Integron-haltigen Isolate stammten dabei zu 7 % aus Ambulanzen, zu 21 % aus Normalstationen und zu 72 % aus Intensivstationen. Der erhebliche Einfluss der Resistenzintegrons auf die Resistenz gegenüber Betalaktamen, Aminoglykosiden, Chinolonen, Trimethoprim und Chloramphenicol wurde auch anhand eines beobachtbaren

durchschnittlichen Größenzuwachses der detektierten Resistenzgenkassetten und der zur Expression der darin enthaltenen Resistenzgene notwendigen starken Promotoren unterstrichen. Im Jahr 1993/94 betrug die durchschnittliche Größe der Genkassetten 650 - 1000 bp und 3/12 Isolaten besaßen starke Promotoren, 4 Jahre später stieg sie auf 800 - 3000 bp und 27 von 46 Isolaten besaßen starke Promotoren. Die Autoren leiten daraus die Schlussfolgerung ab, dass Integrons im Verlauf der vierjährigen Beobachtungszeit nicht nur einen Zuwachs an Resistenzgenen zeigten, sondern durch die Zunahme an starken Promotoren auch in der Lage waren, diese Resistenzgene zur Expression zu bringen. Für die Resistenzentwicklung bei den *Enterobacteriaceae* sind dabei vor allem die Betalaktamantibiotika von Bedeutung, da diese größte Gruppe antimikrobieller Substanzen vor allem in Form von Cephalosporinen häufig zur Therapie eingesetzt wird. Besonders der Einsatz von Cephalosporinen der dritten Gruppe übt dabei einen Selektionsdruck für so genannte Extended Spektrum Betalaktamasen (ESBL) aus⁵⁶.

In dieser Studie lag dieser Selektionsdruck für Ceftriaxon bei 1100 DDDs pro 1000 Patiententagen; von Cefotaxim wurden 948 DDDs pro 1000 Patiententage verabreicht. Im Vergleich zu den Referenzdaten des SARI-Projektes, an dem im Zeitraum von 2000 bis 2005 18 chirurgische Intensivstationen teilnahmen, lag die Zahl der durchschnittlich verabreichten DDDs für Ceftriaxon bei 731, für Ceftazidim bei 459 DDDs pro 1000 Patiententagen (<http://www.sari-antibiotika.de/allgemei/down/ad-ich.pdf>). Somit war der Antibiotikaselektionsdruck im Vergleich zu anderen chirurgischen Intensivstationen etwa doppelt so groß.

4.4 Integron-vermittelte Resistenz: Unterscheidung zwischen klonaler Verbreitung Integron-haltiger Bakterienisolate und der Verbreitung von Integrons auf nosokomiale Erreger?

Die Untersuchung der 59 beobachteten Patienten kann zur Beantwortung dieser Frage nur eine orientierende Einschätzung liefern. Da Patienten weder unter Studienbedingungen noch im klinischen Alltag frei von Einflüssen durch Antibiotika sind, sind die beobachteten Ergebnisse unserer Studie nur mit entsprechenden Einschränkungen zu interpretieren:

Feldversuche von Levy et al. zeigten anhand einer repräsentativen Zahl von Stuhlkultur-Stichproben von Menschen aus der Region Katmandu, die lebenslang keinen Kontakt zu

Antibiotika hatten, dass einige Gram-negative Bakterienarten aus der Stuhlflora ohne Antibiotikaselektionsdruck Resistenzen gegenüber Amoxycillin, Cephalotin, Chloramphenikol, Tetracyclin und Cotrim aufwiesen^{15,77}. Auch wenn die Resistenzentwicklung direkt mit der Entfernung der Probanden von der erreichbaren (westlichen) medizinischen Versorgung in einer der Großstädte Nepals korrelierte, zeigte sich bei Trimethoprim-Sulfamethoxazol, eine geringfügig höhere Resistenzrate in der ländlichsten Region ohne diesen Zugang.

In Deutschland kann von einer flächendeckenden ärztlichen Versorgung ausgegangen werden. Nach den Ergebnissen der Libra-Studie (<http://www.librainitiative.com/life/en/index.html>) werden ca. 80% aller Antibiotika vom Hausarzt/Niedergelassenen Facharzt verabreicht. Es ist daher a priori in unserem Studienkollektiv davon auszugehen, dass die Mehrzahl der untersuchten Patienten in der Anamnese bereits vor ihrem stationären Aufenthalt in der Beobachtungszeit Zugang zu Antibiotika hatten. In wiefern daher Antibiotika-Therapien in der Vorgeschichte der Patienten bereits Einfluss auf die Zusammensetzung der Besiedlungsflora hatte, ließ sich nicht näher ermitteln. Aus den Patientenakten konnte lediglich festgestellt werden, dass die untersuchten Patienten vor Aufnahme in die Studie im Durchschnitt bereits ca. 6 Tage auf einer Intensivstation, bzw, ca. 7 Tage auf einer Pflegestation verbracht hatten und somit mit großer Wahrscheinlichkeit einem Antibiotikaselektionsdruck ausgesetzt waren.

Darüber hinaus bestanden bei einem Teilkollektiv weitere Risikofaktoren für den Erwerb multiresistenter nosokomialer Erreger. Dazu zählen das Patientenalter (der Alterdurchschnitt des Patientenkollektivs lag bei 64 Jahren), bestimmte Grunderkrankungen und Therapien (20,34% hatten eine onkologische Diagnose, bei 12 Patienten (20,34%) wurde während des Beobachtungszeitraumes eine Dialyse durchgeführt). Als Maß zur Beurteilung der Morbidität wurde zusätzlich der APACHE II Score bestimmt, sein Durchschnittswert lag in dem hier beobachteten Patientenkollektiv bei 21,03 (Standardabweichung von 7,16). Erwartungsgemäß wies die Mehrzahl der Patienten auf der Intensivstation ein erhöhtes Risiko für eine Letalität auf. Auch der Sepsis-related Organ Failure (SOFA) Score deutet darauf hin, dass mit einem Durchschnittswert von 8,8 (bei einem maximal erreichbaren Wert von 24) bei einigen Patienten Sepsisfälle aufgetreten sind.

4.5 Auftreten von ESBL

Während die in der infektiologischen Diagnostik gefundenen ESBL eher sporadisch auftraten (Daten nicht gezeigt, Auswertung der nach §23 Infektionsschutzgesetz gesammelten Daten), ergab die umfassende Untersuchung der Gram- negativen Isolate, die vor allem aus der Besiedlungsflora der Patienten stammten, einen Anteil von insgesamt 7,07%, wobei *Escherichia coli* mit 17 ESBL einen Anteil von 29,82% und *Klebsiella* spp. mit 3 ESBL-positiven Isolaten einen Anteil von 7,5% an den gefundenen *Enterobacteriaceae* mit diesen Betalaktamasen hatte. Das sporadische Vorkommen von ESBL bei Isolaten, die mit infektiologischer Fragestellung gewonnen wurden, ist dabei mitunter durch methodische Schwierigkeiten beim Nachweis im Routinelabor zu erklären^{3 52}. Von größerer Bedeutung für die geringe Nachweisrate in der mikrobiologischen Routinediagnostik dürfte aber die wesentlich wichtigere Rolle der Besiedlungsflora bei der Entstehung von Resistenzen bei Gram-negativen Erregern sein¹⁶. Im Gegensatz zu Isolaten, die für eine gezielte infektiologische Diagnostik gewonnen werden, ist die Besiedlungsflora nur im Rahmen einer aktiven Surveillance mit Gewinnung von Abstrichen aus der Leistenregion, Stuhlproben und Untersuchungsmaterialien aus dem oberen Respirationstrakt einer gezielten Untersuchung auf resistente Gram-negative Erreger einschließlich ESBL zugänglich.

4.6 Welche Rolle spielen die Integrons bei der Verbreitung von ESBL?

Bei der Betrachtung der Fragestellung, ob beim Auftreten von ESBL und Integrons eine Koinzidenz existiert, kann aufgrund der vorliegenden Ergebnisse nicht entschieden werden. Die erreichten Fallzahlen im Beobachtungszeitraum lassen keine statistisch belegbare Aussage zu. So waren nur ein Stamm (5%) der 20 detektierten ESBL-Bakterien auch gleichzeitig integron-positiv. Allerdings wird in Studien diese Frage kontrovers diskutiert. So wurde von Machado *et al.* in einer Studie aus Spanien mit einem Beobachtungszeitraum von 12 Jahren aus dem Jahre 2005³⁸ postuliert, dass der Beitrag von Integrons mit zeitgleichen Auftreten von ESBL nur eine geringe Signifikanz aufweist. Im Gegensatz dazu wurde von Villa *et al.*⁷⁵ die Vermutung aufgestellt, dass Integrons eine Rolle bei der ESBL Entstehung spielen. Bei dieser Studie wurden häufig ESBL kodierende Gene in Assoziation mit Integrons

entdeckt, so dass man hier von einer starken Rolle von Integrins bei dem Auftreten von ESBL ausging. Auch hier bedarf es sicherlich noch gezielter Studien, um endgültig Klarheit über die Rolle der Integrins bei dem Auftreten von ESBL zu schaffen.

5. Literatur

1. **Arakawa, Y., M. Murakami, K. Suzuki, H. Ito, R. Wacharotayankun, S. Ohsuka, N. Kato, and M. Ohta.** 1995. A novel integron-like element carrying the metallo-beta-lactamase gene blaIMP. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**:1612-1615.
2. **Bauernfeind A and Peters G.** Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie. 304-344. 1994.
3. **Bradford, P. A.** 2001. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**:933-51, table.
4. **Brown, H. J., H. W. Stokes, and R. M. Hall.** 1996. The integrons In0, In2, and In5 are defective transposon derivatives. *J. Bacteriol.* **178**:4429-4437.
5. **Bunny, K. L., R. M. Hall, and H. W. Stokes.** 1995. New mobile gene cassettes containing an aminoglycoside resistance gene, aacA7, and a chloramphenicol resistance gene, catB3, in an integron in pBWH301. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**:686-693.
6. **Cameron, F. H., D. J. Groot Obbink, V. P. Ackerman, and R. M. Hall.** 1986. Nucleotide sequence of the AAD(2'') aminoglycoside adenylyltransferase determinant aadB. Evolutionary relationship of this region with those surrounding aadA in R538-1 and dhfrII in R388. *Nucleic Acids Res.* **14**:8625-8635.
7. **Clark, C. A., L. Purins, P. Kaewrakon, T. Focareta, and P. A. Manning.** 2000. The *Vibrio cholerae* O1 chromosomal integron. *Microbiology* **146** (Pt 10):2605-2612.
8. **Collis, C. M., G. Grammaticopoulos, J. Briton, H. W. Stokes, and R. M. Hall.** 1993. Site-specific insertion of gene cassettes into integrons. *Mol. Microbiol.* **9**:41-52.
9. **Collis, C. M. and R. M. Hall.** 1992. Gene cassettes from the insert region of integrons are excised as covalently closed circles. *Mol. Microbiol.* **6**:2875-2885.
10. **Collis, C. M. and R. M. Hall.** 1992. Site-specific deletion and rearrangement of integron insert genes catalyzed by the integron DNA integrase. *J. Bacteriol.* **174**:1574-1585.
11. **Collis, C. M. and R. M. Hall.** 1995. Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**:155-162.
12. **Collis, C. M., M. J. Kim, S. R. Partridge, H. W. Stokes, and R. M. Hall.** 2002. Characterization of the class 3 integron and the site-specific recombination system it determines. *J. Bacteriol.* **184**:3017-3026.

13. **Correia, M., F. Boavida, F. Grosso, M. J. Salgado, L. M. Lito, J. M. Cristino, S. Mendo, and A. Duarte.** 2003. Molecular characterization of a new class 3 integron in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:2838-2843.
14. **Denton, M. and K. G. Kerr.** 1998. Microbiological and clinical aspects of infection associated with *Stenotrophomonas maltophilia*. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**:57-80.
15. **Farr, B. M., C. D. Salgado, T. B. Karchmer, and R. J. Sherertz.** 2001. Can antibiotic-resistant nosocomial infections be controlled? *Lancet Infect. Dis.* **1**:38-45.
16. **Farr, B. M., C. D. Salgado, T. B. Karchmer, and R. J. Sherertz.** 2001. Can antibiotic-resistant nosocomial infections be controlled? *Lancet Infect. Dis.* **1**:38-45.
17. **Fleming, A.** 2001. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. 1929. *Bull. World Health Organ* **79**:780-790.
18. **Fling, M. E., J. Kopf, and C. Richards.** 1985. Nucleotide sequence of the transposon Tn7 gene encoding an aminoglycoside-modifying enzyme, 3''(9)-O-nucleotidyltransferase. *Nucleic Acids Res.* **13**:7095-7106.
19. **Fling, M. E. and C. Richards.** 1983. The nucleotide sequence of the trimethoprim-resistant dihydrofolate reductase gene harbored by Tn7. *Nucleic Acids Res.* **11**:5147-5158.
20. **Fluit, A. C. and F. J. Schmitz.** 1999. Class 1 integrons, gene cassettes, mobility, and epidemiology. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **18**:761-770.
21. **Fluit, A. C. and F. J. Schmitz.** 2004. Resistance integrons and super-integrons. *Clin. Microbiol. Infect.* **10**:272-288.
22. **Goldstein, C., M. D. Lee, S. Sanchez, C. Hudson, B. Phillips, B. Register, M. Grady, C. Liebert, A. O. Summers, D. G. White, and J. J. Maurer.** 2001. Incidence of class 1 and 2 integrases in clinical and commensal bacteria from livestock, companion animals, and exotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:723-726.
23. **Gonzalez, G., K. Sossa, H. Bello, M. Dominguez, S. Mella, and R. Zemelman.** 1998. Presence of integrons in isolates of different biotypes of *Acinetobacter baumannii* from Chilean hospitals. *FEMS Microbiol. Lett.* **161**:125-128.
24. **Gonzalez, G., K. Sossa, H. Bello, M. Dominguez, S. Mella, and R. Zemelman.** 1998. Presence of integrons in isolates of different biotypes of *Acinetobacter baumannii* from Chilean hospitals. *FEMS Microbiol. Lett.* **161**:125-128.
25. **Hall, R. M., D. E. Brookes, and H. W. Stokes.** 1991. Site-specific insertion of genes into integrons: role of the 59-base element and determination of the recombination cross-over point. *Mol. Microbiol.* **5**:1941-1959.

26. **Hall, R. M., H. J. Brown, D. E. Brookes, and H. W. Stokes.** 1994. Integrons found in different locations have identical 5' ends but variable 3' ends. *J. Bacteriol.* **176**:6286-6294.
 27. **Hall, R. M. and C. M. Collis.** 1995. Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. *Mol. Microbiol.* **15**:593-600.
 28. **Hall, R. M., C. M. Collis, M. J. Kim, S. R. Partridge, G. D. Recchia, and H. W. Stokes.** 1999. Mobile gene cassettes and integrons in evolution. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **870**:68-80.
 29. **Hall, R. M. and C. Vockler.** 1987. The region of the IncN plasmid R46 coding for resistance to beta-lactam antibiotics, streptomycin/spectinomycin and sulphonamides is closely related to antibiotic resistance segments found in IncW plasmids and in Tn21-like transposons. *Nucleic Acids Res.* **15**:7491-7501.
 30. **Hansson, K., L. Sundstrom, A. Pelletier, and P. H. Roy.** 2002. IntI2 integron integrase in Tn7. *J. Bacteriol.* **184**:1712-1721.
 31. **Hansson, K., L. Sundstrom, A. Pelletier, and P. H. Roy.** 2002. IntI2 integron integrase in Tn7. *J. Bacteriol.* **184**:1712-1721.
 32. **Heidelberg, J. F., J. A. Eisen, W. C. Nelson, R. A. Clayton, M. L. Gwinn, R. J. Dodson, D. H. Haft, E. K. Hickey, J. D. Peterson, L. Umayam, S. R. Gill, K. E. Nelson, T. D. Read, H. Tettelin, D. Richardson, M. D. Ermolaeva, J. Vamathevan, S. Bass, H. Qin, I. Dragoi, P. Sellers, L. McDonald, T. Utterback, R. D. Fleishmann, W. C. Nierman, O. White, S. L. Salzberg, H. O. Smith, R. R. Colwell, J. J. Mekalanos, J. C. Venter, and C. M. Fraser.** 2000. DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature* **406**:477-483.
 33. **Jones, M. E., E. Peters, A. M. Weersink, A. Fluit, and J. Verhoef.** 1997. Widespread occurrence of integrons causing multiple antibiotic resistance in bacteria. *Lancet* **349**:1742-1743.
 34. **Knaus, W. A., E. A. Draper, D. P. Wagner, and J. E. Zimmerman.** 1985. APACHE II: a severity of disease classification system. *Crit Care Med.* **13**:818-829.
 35. **Leverstein-Van Hall, M. A., A. Paauw, A. T. Box, H. E. Blok, J. Verhoef, and A. C. Fluit.** 2002. Presence of integron-associated resistance in the community is widespread and contributes to multidrug resistance in the hospital. *J. Clin. Microbiol.* **40**:3038-3040.
 36. **Levesque, C., S. Brassard, J. Lapointe, and P. H. Roy.** 1994. Diversity and relative strength of tandem promoters for the antibiotic-resistance genes of several integrons. *Gene* **142**:49-54.
 37. **Levesque, C., L. Piche, C. Larose, and P. H. Roy.** 1995. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**:185-191.
-

38. **Machado, E., R. Canton, F. Baquero, J. C. Galan, A. Rollan, L. Peixe, and T. M. Coque.** 2005. Integron content of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* strains over 12 years in a single hospital in Madrid, Spain. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:1823-1829.
39. **Mahenthiralingam, E., M. E. Campbell, J. Foster, J. S. Lam, and D. P. Speert.** 1996. Random amplified polymorphic DNA typing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered from patients with cystic fibrosis. *J. Clin. Microbiol.* **34**:1129-1135.
40. **Martinez, E. and C. F. de la.** 1988. Transposon Tn21 encodes a RecA-independent site-specific integration system. *Mol. Gen. Genet.* **211**:320-325.
41. **Martinez, E. and C. F. de la.** 1990. Genetic elements involved in Tn21 site-specific integration, a novel mechanism for the dissemination of antibiotic resistance genes. *EMBO J.* **9**:1275-1281.
42. **Martinez-Freijo, P., A. C. Fluit, F. J. Schmitz, V. S. Grek, J. Verhoef, and M. E. Jones.** 1998. Class I integrons in Gram-negative isolates from different European hospitals and association with decreased susceptibility to multiple antibiotic compounds. *J. Antimicrob. Chemother.* **42**:689-696.
43. **Martinez-Freijo, P., A. C. Fluit, F. J. Schmitz, J. Verhoef, and M. E. Jones.** 1999. Many class I integrons comprise distinct stable structures occurring in different species of Enterobacteriaceae isolated from widespread geographic regions in Europe. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:686-689.
44. **Mazel, D., B. Dychinco, V. A. Webb, and J. Davies.** 1998. A distinctive class of integron in the *Vibrio cholerae* genome. *Science* **280**:605-608.
45. **McIver, C. J., P. A. White, L. A. Jones, T. Karagiannis, J. Harkness, D. Marriott, and W. D. Rawlinson.** 2002. Epidemic strains of *Shigella sonnei* biotype g carrying integrons. *J. Clin. Microbiol.* **40**:1538-1540.
46. **Meyer, J. F., B. A. Nies, and B. Wiedemann.** 1983. Amikacin resistance mediated by multiresistance transposon Tn2424. *J. Bacteriol.* **155**:755-760.
47. **Naas, T., Y. Mikami, T. Imai, L. Poirel, and P. Nordmann.** 2001. Characterization of In53, a class 1 plasmid- and composite transposon-located integron of *Escherichia coli* which carries an unusual array of gene cassettes. *J. Bacteriol.* **183**:235-249.
48. **Nijssen, S., A. Florijn, J. Top, R. Willems, A. Fluit, and M. Bonten.** 2005. Unnoticed spread of integron-carrying Enterobacteriaceae in intensive care units. *Clin. Infect. Dis.* **41**:1-9.
49. **Orman, B. E., S. A. Pineiro, S. Arduino, M. Galas, R. Melano, M. I. Caffer, D. O. Sordelli, and D. Centron.** 2002. Evolution of multiresistance in nontyphoid salmonella serovars from 1984 to 1998 in Argentina. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:3963-3970.

50. **Ouellette, M., L. Bissonnette, and P. H. Roy.** 1987. Precise insertion of antibiotic resistance determinants into Tn21-like transposons: nucleotide sequence of the OXA-1 beta-lactamase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **84**:7378-7382.
 51. **Ouellette, M. and P. H. Roy.** 1987. Homology of ORFs from Tn2603 and from R46 to site-specific recombinases. *Nucleic Acids Res.* **15**:10055.
 52. **Pfaller, M. A. and J. Segreti.** 2006. Overview of the epidemiological profile and laboratory detection of extended-spectrum beta-lactamases. *Clin. Infect. Dis.* **42 Suppl 4**:S153-S163.
 53. **Povoa, P., L. Coelho, E. Almeida, A. Fernandes, R. Mealha, P. Moreira, and H. Sabino.** 2005. C-reactive protein as a marker of infection in critically ill patients. *Clin. Microbiol. Infect.* **11**:101-108.
 54. **Pugin, J., R. Auckenthaler, N. Mili, J. P. Janssens, P. D. Lew, and P. M. Suter.** 1991. Diagnosis of ventilator-associated pneumonia by bacteriologic analysis of bronchoscopic and nonbronchoscopic "blind" bronchoalveolar lavage fluid. *Am. Rev. Respir. Dis.* **143**:1121-1129.
 55. **Radstrom, P., O. Skold, G. Swedberg, J. Flensburg, P. H. Roy, and L. Sundstrom.** 1994. Transposon Tn5090 of plasmid R751, which carries an integron, is related to Tn7, Mu, and the retroelements. *J. Bacteriol.* **176**:3257-3268.
 56. **Ramphal, R. and P. G. Ambrose.** 2006. Extended-spectrum beta-lactamases and clinical outcomes: current data. *Clin. Infect. Dis.* **42 Suppl 4**:S164-S172.
 57. **Recchia, G. D. and R. M. Hall.** 1995. Gene cassettes: a new class of mobile element. *Microbiology* **141 (Pt 12)**:3015-3027.
 58. **Recchia, G. D., H. W. Stokes, and R. M. Hall.** 1994. Characterisation of specific and secondary recombination sites recognised by the integron DNA integrase. *Nucleic Acids Res.* **22**:2071-2078.
 59. **Rowe-Magnus, D. A., A. M. Guerout, P. Ploncard, B. Dychinco, J. Davies, and D. Mazel.** 2001. The evolutionary history of chromosomal super-integrations provides an ancestry for multiresistant integrons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**:652-657.
 60. **Rowe-Magnus, D. A. and D. Mazel.** 1999. Resistance gene capture. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**:483-488.
 61. **Rowe-Magnus, D. A. and D. Mazel.** 2001. Integrons: natural tools for bacterial genome evolution. *Curr. Opin. Microbiol.* **4**:565-569.
 62. **Rowe-Magnus, D. A. and D. Mazel.** 2002. The role of integrons in antibiotic resistance gene capture. *Int. J. Med. Microbiol.* **292**:115-125.
 63. **Sallen, B., A. Rajoharison, S. Desvarenne, and C. Mabilat.** 1995. Molecular epidemiology of integron-associated antibiotic resistance genes in clinical isolates of enterobacteriaceae. *Microb. Drug Resist.* **1**:195-202.
-

64. **Schmidt, F. and I. Klopfer-Kaul.** 1984. Evolutionary relationship between Tn21-like elements and pBP201, a plasmid from *Klebsiella pneumoniae* mediating resistance to gentamicin and eight other drugs. *Mol. Gen. Genet.* **197**:109-119.
65. **Schmitz FJ, Martinez-Freijo P, Theis S, Fluit A, Verhoef J, and Heinz HP.** Prevalence of class I integrons and association with decreased antibiotic susceptibility in German gram negative blood culture isolates. 496-498. 2000. *Clin.Microbiol.Infect.*
66. **Schmitz, F. J., P. Martinez-Freijo, S. Theis, A. C. Fluit, J. Verhoef, H. P. Heinz, and M. E. Jones.** 1999. Class I integrons: prevalence and impact on antibiotic susceptibility in 278 consecutive unrelated Gram-negative blood isolates. *Clin. Microbiol. Infect.* **5**:496-498.
67. **Senda, K., Y. Arakawa, S. Ichiyama, K. Nakashima, H. Ito, S. Ohsuka, K. Shimokata, N. Kato, and M. Ohta.** 1996. PCR detection of metallo-beta-lactamase gene (blaIMP) in gram-negative rods resistant to broad-spectrum beta-lactams. *J. Clin. Microbiol.* **34**:2909-2913.
68. **Stokes, H. W. and R. M. Hall.** 1989. A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. *Mol. Microbiol.* **3**:1669-1683.
69. **Sundstrom, L., P. Radstrom, G. Swedberg, and O. Skold.** 1988. Site-specific recombination promotes linkage between trimethoprim- and sulfonamide resistance genes. Sequence characterization of dhfrV and sull and a recombination active locus of Tn21. *Mol. Gen. Genet.* **213**:191-201.
70. **Sundstrom, L., P. H. Roy, and O. Skold.** 1991. Site-specific insertion of three structural gene cassettes in transposon Tn7. *J. Bacteriol.* **173**:3025-3028.
71. **Tanaka, M., T. Yamamoto, and T. Sawai.** 1983. Evolution of complex resistance transposons from an ancestral mercury transposon. *J. Bacteriol.* **153**:1432-1438.
72. **Tiemersma, E. W., S. L. Bronzwaer, O. Lyytikainen, J. E. Degener, P. Schrijnemakers, N. Bruinsma, J. Monen, W. Witte, and H. Grundman.** 2004. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe, 1999-2002. *Emerg. Infect. Dis.* **10**:1627-1634.
73. **Vaisvila, R., R. D. Morgan, J. Posfai, and E. A. Raleigh.** 2001. Discovery and distribution of super-integrons among pseudomonads. *Mol. Microbiol.* **42**:587-601.
74. **Versalovic, J., T. Koeuth, and J. R. Lupski.** 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* **19**:6823-6831.
75. **Villa, L., C. Pezzella, F. Tosini, P. Visca, A. Petrucca, and A. Carattoli.** 2000. Multiple-antibiotic resistance mediated by structurally related IncL/M plasmids carrying an extended-spectrum beta-lactamase gene and a class 1 integron. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:2911-2914.

76. **Vincent, J. L., R. Moreno, J. Takala, S. Willatts, A. de Mendonca, H. Bruining, C. K. Reinhart, P. M. Suter, and L. G. Thijs.** 1996. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med.* **22**:707-710.
77. **Walson, J. L., B. Marshall, B. M. Pokhrel, K. K. Kafle, and S. B. Levy.** 2001. Carriage of antibiotic-resistant fecal bacteria in Nepal reflects proximity to Kathmandu. *J. Infect. Dis.* **184**:1163-1169.
78. **Ward, J. M. and J. Grinsted.** 1982. Physical and genetic analysis of the Inc-W group plasmids R388, Sa, and R7K. *Plasmid* **7**:239-250.

Curriculum vitae

Name: Thomas Garn

Geburtsdatum: 26.10.1976

Geburtsort: Wuppertal

Familienstand: ledig

Schul Ausbildung: 1983 - 1987 Grundschule, Schwelm
1987 - 1996 Märkisches-Gymnasium, Schwelm

Schulabschluss: 1996 allgemeine Hochschulreife

Ersatzdienst: 8/1996 - 9/1997
Zivildienst im Labor des EN-SÜD Klinikums Martfeld, Schwelm

Hochschullaufbahn: 10/1997 – 5/2005
Studium der Humanmedizin an der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

Praktisches Jahr: 4/2004 – 8/2004
Uniklinik Balgrist Zürich (Orthopädie)
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. C. Gerber

8/2004 – 12/2004
St. Antonius Klinikum Wuppertal (Chirurgie)
Chefarzt: Dr. med. K. Damanakis

12/2004 – 3/2005
St. Antonius Klinikum Wuppertal (Innere Medizin)
Ärztlicher Direktor: Dr. med. J. Köbberling

Berufliche Laufbahn: 9/2005 - 8/2007
Chirurgie; Katharinen Hospital Willich
Chefarzt: Dr. med. T. Carus

seit 9/2007
Chirurgie; Evangelisches Krankenhaus Düsseldorf
Chefarzt: Prof. Dr. med. H-J. Krämling

Düsseldorf, 07.07.2008

8. Danksagung / Widmung

Wenn man so eine Widmung schreibt, sollte man sich im Vorfeld sehr gut überlegen, wem man so ein Werk widmet. Da liegen natürlich gewisse Dinge nah: der Freundin, den Eltern, den Großeltern usw. Ich habe mir sehr lange Gedanken gemacht.

Meine Eltern haben einen großen Anteil daran, dass ich bin was und wer ich bin. Sie haben mich immer und in jeder Lebenslage unterstützt und gefördert. Sie waren immer da, wenn ich sie brauchte. Auf diesem Wege möchte ich mich für all ihre Unterstützung und Liebe bedanken.

Auch meinen beiden Großmüttern möchte ich an dieser Stelle, für ihre Unterstützung danken, da auch sie immer da waren, wenn ich sie gebraucht habe, da sie mir Dinge ermöglicht haben, die ohne sie auf keinen Fall möglich gewesen wären.

Ein großer Dank gilt vor allem meiner Freundin, denn sie trägt natürlich ebenfalls einen großen Teil daran, dass ich an meinem Ziel ankomme. Sie hält mir den Rücken frei, wenn es mal wieder stressig ist und gibt einem eine geschützte Rückzugsmöglichkeit. Sie steht einem mit Rat und Tat zur Seite. Sie gibt mir sehr viel Kraft und Liebe, so dass ich sehr glücklich mit ihr bin.

Ebenfalls möchte ich Roland Geisel danken. Ich habe mich jederzeit sehr gut betreut gefühlt. Durch sein Engagement und seine Kreativität ist diese Doktorarbeit erst möglich geworden. Er ist seit Beginn der Doktorarbeit ein Freund geworden.

Allerdings gibt bzw. gab es einen Menschen in meiner Umgebung der mich sehr geprägt hat und mir Dinge vermittelt hat, denen ich mir zum Teil erst heute richtig bewusst werde. Ein Mensch der leider schon vor Beginn meines Studiums verstorben ist und der mit Sicherheit jetzt sehr stolz auf mich wäre. Ein Mensch der mir gezeigt hat, dass man sich die Freude am Leben niemals nehmen lassen sollte. Dass das Leben mit Humor und Freude einem Dinge schenkt, und Betrachtungsweisen eröffnet, die man ohne sie niemals hätte. Dass man im richtigen Augenblick Verantwortung übernehmen muss und die gebührende Ernsthaftigkeit

an den Tag legt, die die Situation erfordert. Dass Hilfsbereitschaft und Fürsorge die höchsten Güter sind, die man mit anderen Menschen teilen kann. Die Rede ist von meinem Großvater Hans Tilgner. Ein Mann der Dinge erlebt hat und Zeiten durchgemacht hat, die man sich heutzutage nicht mal annähernd mehr vorstellen kann. Ein Mann der trotzdem nie verlernt hat zu Lachen und fröhlich zu sein. Er hat mein Leben sehr geprägt und ich möchte ihm diese Doktorarbeit widmen und auf diese Art und Weise „Danke!“ sagen.

„Sicherlich ist kein Tag mehr vergeudet als einer, an dem man überhaupt nicht gelacht hat.“

Nicolas Chamfort (1741-94)

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Studie wurden das Vorkommen und die Verbreitungsmechanismen von Integron-Resistenzkassetten bei Gram-negativen Erregern im Bereich einer Intensivstation untersucht. Das Patientenkollektiv bestand aus Patienten einer chirurgischen Intensivstation mit einer durchschnittlichen Liegezeit von 8,8 Tagen. Bei insgesamt 9 von 56 untersuchten Patienten (15,25%) konnten 22 Integron-positive Isolate nachgewiesen werden, ausschließlich *Klebsiella* spp., *Pseudomonas aeruginosa* und *Escherichia coli*. Das durchschnittliche Alter dieser Patienten lag bei 74,84 Jahren und somit 11,2 Jahre über dem des Gesamtkollektivs. Die den Nachweis vorausgegangene durchschnittliche Liegedauer auf der Intensivstation betrug 10,23 Tage während Patienten ohne Integronnachweis 8,78 Tage auf der Station verbrachten. Die Analyse der phänotypischen Resistenzbestimmungen mit Hilfe der Mikrodilutionsmethode zeigte bei Integron-positiven Isolaten, dass diese Erreger alle gegenüber Ampicillin resistent waren. Der genetische Hintergrund hierfür liegt aber nicht bei Integron-vermittelten Resistenzgenen, sondern beruht auf chromosomalen AmpC Resistenzgenen, die bei *Klebsiellen* und *Pseudomonas* zur festen Resistenzgen-Ausstattung gehören. 95,45% aller untersuchten Integron-positiven Isolate hatten eine Resistenz gegenüber Piperacillin allein ohne den Penicillinaseinhibitor Tazobactam. Erwartungsgemäß zeigte sich, dass mit nur 4,55% aller Integron-positiven Isolate ein geringer Anteil resistent gegenüber Meropenem waren. Mit Hilfe der NCCLS Definition konnten 7,07% aller untersuchten Isolate als Extended-spectrum β -Laktamase (ESBL)-Bildner identifiziert werden. Bei *Escherichia coli* wiesen insgesamt 29,82% einen ESBL-Phänotyp auf, bei *Klebsiella* spp. waren es 7,5%. Bei der Detektion von Integron-Genkassetten waren bei insgesamt 7,42% der Isolate Integrons der Klasse 1 nachzuweisen. Bei 40% aller *Klebsiella* spp. sowie bei 5,26% aller *Escherichia coli* wurde ein Integron der Klasse 1 nachgewiesen. Die Häufigkeit von Klasse 2 Integrons war mit 6,01% Klasse 2-Integron haltigen Isolaten im Vergleich zu Klasse 1 nur geringfügig niedriger. Hierbei waren ebenfalls die *Klebsiella* spp. (37,5%) am häufigsten vertreten, gefolgt von *Escherichia coli* mit 4,35%. Im Verlauf der Studie wiesen insgesamt 4 Folgeisolate (3x *Escherichia coli* / 1x *Pseudomonas aeruginosa*) ein Integron auf, das beim Erstisolat noch nicht vorhanden war. Vereinzelt wurden klonal identische Stämme bei Patienten aus räumlich benachbarten Patientenzimmern nachgewiesen, was eventuell auf eine Transmission zurückgeführt werden kann. Bei der Suche nach einer Korrelation zwischen Transmissionsquellen aus der belebten und unbelebten Umgebung der Patienten und dem Auftreten von Integron-positiven Isolaten konnte eine leicht erhöhte Odds Ratio für die Liegedauer der Magensonde und Auftreten von Integron-positiven Isolaten errechnet werden. Insgesamt muss allerdings aus statistischer Sicht festgestellt werden, dass das beobachtete Patientenkollektiv eine zu kleine Fallzahl aufwies, um eine signifikante Aussage zum Auftreten von Integron-Genkassetten zu machen. Hierfür bedarf es sicherlich noch weiterer, größer angelegter prospektiver Studien.